

Biochemische und strukturelle Untersuchungen an Proteinen des reduktiven Acetyl-CoA-Weges

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie
eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Sebastian Manfred Götzl

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter: 1. Prof. Dr. Holger Dobbek
 2. Prof. Dr. Thomas Eitinger
 3. Prof. Dr. Peter Hildebrandt

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2014

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Dobbek von September 2009 bis März 2010 in der Arbeitsgruppe Bioanorganische Chemie an der Universität Bayreuth und von April 2010 bis Mai 2014 in der Abteilung Biochemie / Strukturbiochemie an der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. Im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation wurde an folgenden Publikationen mitgewirkt:

S. Goetzl, J.-H. Jeoung, S. E. Hennig, H. Dobbek: „Structural Basis for Electron and Methyl-Group Transfer in a Methyltransferase System Operating in the Reductive Acetyl-CoA Pathway.“ *J Mol Biol* **411**, 96–109 (2011).

S. E. Hennig, J.-H. Jeoung, S. Goetzl, H. Dobbek: „Redox-dependent complex formation by an ATP-dependent activator of the corrinoid/iron-sulfur protein.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5235 (2012).

J.-H. Jeoung, S. Goetzl, S. E. Hennig, J. Fessler, C. Wörmann, J. Dendra, H. Dobbek: „The Extended Reductive Acetyl-CoA Pathway: ATPases in Metal Cluster Maturation and Reductive Activation.“ *Biol Chem* **395**, 545-58 (2014), Übersichtsartikel.

S. E. Hennig, S. Goetzl, J.-H. Jeoung, M. Bommer, F. Lendzian, P. Hildebrandt, H. Dobbek: „ATP-induced protein-protein electron transfer by redox-selective partner recognition.“ *Nat Commun* **5**, 4626 (2014).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung.....	IV
Summary	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Autotrophe Kohlenstoff-Fixierung.....	1
1.2 Autotrophe CO₂-Fixierung durch den reduktiven Acetyl-CoA-Weg.....	2
1.3 Proteine der finalen Schritte des reduktiven Acetyl-CoA-Weges.....	4
1.3.1 Methyltransferase (MeTr).....	4
1.3.2 Corrinoid-Eisen/Schwefel-Protein (CoFeSP)	6
1.3.3 Reduktiver Aktivator von CoFeSP (RACo)	7
1.3.4 Acetyl-CoA-Synthase / CO-Dehydrogenase (ACS/CODH).....	9
1.4 Reduktiver Acetyl-CoA-Weg in <i>Carboxydotherrnus hydrogenofornans</i>.....	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Anoxisches Arbeiten.....	15
2.2 Metallfreies Arbeiten	15
2.3 Chemikalien und Materialien.....	15
2.4 Bakterienstämme	16
2.5 Antibiotika.....	16
2.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	16
2.7 Molekularbiologische Methoden.....	17
2.7.1 Klonierung und Mutagenese von <i>acsC</i> und <i>acsD</i>	18
2.7.2 Klonierung und Mutagenese von <i>acsE</i>	19
2.7.3 Klonierung von <i>acsB</i>	19
2.7.4 Transformation	20
2.8 Heterologe Genexpression in <i>Escherichia coli</i>.....	20
2.8.1 Produktion von MeTr.....	21
2.8.2 Produktion von CfsA, CfsB und CoFeSP.....	21
2.8.3 Produktion von ACS und der C-terminalen ACS-Domäne	21
2.9 Zellaufschluss.....	22
2.10 Reinigung der MeTr	22
2.11 Reinigung des CoFeSP.....	23
2.12 Reinigung der ACS und der C-terminalen ACS-Domäne.....	24

2.13	Bestimmung der Proteinkonzentration	24
2.14	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.15	Analytische Gelfiltration	25
2.16	Bestimmung des Kofaktorgehalts.....	26
2.16.1	Eisengehalt	26
2.16.2	Corrinoidgehalt	26
2.16.3	Total-Reflexions-Röntgen-Fluoreszenz-Spektroskopie (TRXF)	26
2.17	Spektroskopie	27
2.17.1	UV/Vis Spektroskopie.....	27
2.17.2	Fluoreszenzspektroskopie	27
2.18	Generierung des Co(I)-, Co(II)-, CH₃-Co(III)- und corrinoidfreien CoFeSP.....	28
2.19	Aktivitätsmessung.....	29
2.19.1	Bestimmung der MeTr-Aktivität	29
2.19.2	Bestimmung der ACS-Aktivität	30
2.20	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	30
2.21	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS).....	32
2.22	Untersuchungen zur strukturellen Flexibilität des CoFeSP.....	32
2.22.1	Ortsspezifische Markierung von CoFeSP	32
2.22.2	Kinetik der Bildung und Dissoziation des CoFeSP:RACo-Komplex	33
2.22.3	Abstandsbestimmung durch gepulste Elektronendoppelresonanz.....	34
2.23	Röntgenkristallographie.....	35
2.23.1	Kristallisation	35
2.23.2	Datensammlung und Strukturanalyse	36
3	Ergebnisse und Diskussion.....	37
3.1	Die Methyltransferase	37
3.1.1	Genexpression und Reinigung	37
3.1.2	Substrat- und Produktbindung.....	38
3.1.3	Kinetik der Substratbindung	40
3.1.4	Methylgruppentransfer auf Co(I)CoFeSP.....	41
3.1.5	Substrataktivierung durch Protonenaufnahme	42
3.1.6	Kristallisation der MeTr	44
3.1.7	Die Kristallstruktur der MeTr	45
3.1.8	Kleinwinkelstreuexperimente	51
3.1.9	Asn200-vermittelter Methylgruppentransfer in MeTr	52
3.1.10	Mutationsstudien	53
3.2	Das Corrinoid Eisen/Schwefel-Protein.....	57
3.2.1	Heterologe Expression und Reinigung.....	57

3.2.2	Spektroskopische Charakterisierung	58
3.2.3	Kristallisation	59
3.2.4	Die vollständige CoFeSP-Struktur.....	60
3.2.5	Kleinwinkelstreuexperimente	63
3.2.6	Strukturelle Flexibilität des CoFeSP.....	65
3.2.6.1	Doppelte, ortsspezifische Markierung von CoFeSP	65
3.2.6.2	Förster-Resonanzenergietransfer.....	66
3.2.6.3	Gepulste Elektronendoppelresonanz-Messung	72
3.3	Acetyl-CoA-Synthase	75
3.3.1	Heterologe Expression und Reinigung.....	75
3.3.2	UV/Vis-Spektroskopie	77
3.3.3	Metallbindung an ACS.....	77
3.3.4	Aktivitätsmessung.....	80
3.3.5	Kohlenmonoxidbindung an ACS.....	81
3.3.6	Kleinwinkelstreuung der ACS	82
3.3.7	Kristallisation und Struktur der C-terminalen Domäne.....	84
3.3.8	Konformationen des Phe515.....	89
4	Ausblick	92
5	Literatur	93
6	Abkürzungsverzeichnis	103
7	Anhang	106
7.1	Weitere Tabellen.....	106
7.2	Weitere Abbildungen.....	111
8	Danksagung	120
9	Selbstständigkeitserklärung.....	121

Zusammenfassung

Zahlreiche strikt anaerob lebende Mikroorganismen, darunter acetogene Bakterien, Sulfatreduzierer und methanogene Archaeen, nutzen den reduktiven Acetyl-CoA-Weg zur autotrophen Kohlenstoff-Fixierung oder Energiegewinnung. Die letzten Schritte der Acetyl-CoA-Bildung beruhen hierbei auf dem Zusammenspiel dreier Proteine, dem Corrinoid-Eisen/Schwefel-Protein (CoFeSP), der Methyltetrahydrofolat:CoFeSP-Methyltransferase (MeTr) und dem Acetyl-CoA-Synthase/CO-Dehydrogenase-Komplex (ACS/CODH). MeTr katalysiert den reversiblen Transfer einer Methylgruppe von Methyltetrahydrofolat (MeTHF) auf Co(I)CoFeSP, wodurch $\text{CH}_3\text{-Co(III)CoFeSP}$ entsteht. Letzteres gibt die Methylgruppe an das Ni-Ni-[4Fe4S]-Zentrum der ACS/CODH weiter, wo in einer Kondensationsreaktion mit CO und Coenzym A Acetyl-CoA gebildet wird.

Für ein besseres mechanistisches Verständnis wurden MeTr, CoFeSP und die monomere ACS aus *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt und biochemisch und strukturell charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Substratbindung an MeTr durch thermodynamische und kinetische Messungen untersucht. MeTHF bindet stärker an das Enzym als das demethylierte Produkt Tetrahydrofolat (THF) und scheint dabei einem einfachen, einstufigen Bindungsmodell zu folgen. Der pK_s -Wert von MeTHF ist bei pH 5,6 im enzymgebundenen Zustand um 0,2 Einheiten erhöht, was mit einer Substrataktivierung durch Protonierung vereinbar ist. Die Struktur der MeTr konnte im apo-, THF- und MeTHF-gebundenem Zustand bestimmt werden. Dabei wurden Aminosäuren (Met12 und Gln203) identifiziert, die für das Öffnen und Schließen der Substratbindetasche verantwortlich sind. In der produktgebundenen Kristallstruktur wurde eine Konformation des konservierten Asn200 beobachtet, die eine durch Protonierung aktivierte H-N5(+)-CH₃-Position des MeTHF durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren könnte. Mutationsstudien zeigen den Einfluss der konservierten Aspartatreste Asp44, Asp76 und Asp161 auf die Substratbindung und Aktivität der MeTr. Asp44 und Asp76 bilden eine funktionelle Dyade, kommen als Protonendonoren zur Substrataktivierung jedoch nicht in Frage.

Die Kristallstruktur von CoFeSP wurde mit einer Auflösung von 1,95 Å gelöst, wobei erstmals auch die Struktur der flexiblen N-terminalen [4Fe4S]-Cluster-Bindedomäne bestimmt wurde. Die für die Cobalamin-Bindedomäne erwarteten Konformationsänderungen wurden anhand der Interaktion mit dem reduktiven Aktivator von CoFeSP (RACo) analysiert. Durch Förster-Resonanzenergietransfer wurde eine Annäherung der ortsspezifisch markierten

CoFeSP-Positionen beobachtet und anhand des Fluoreszenzsignals die Kinetik der Komplexbildung mit RACo bestimmt. Durch gepulste Elektronendoppelresonanz konnte eine Abstandsänderung von 11 Å nachgewiesen werden.

ACS wurde als apo-Enzym gereinigt und durch NiCl_2 -Rekonstitution in die aktive Form überführt. Eine Analyse der Metallbindung an apo-ACS zeigt, dass Zn^{2+} besser als das katalytisch relevante Ni^{2+} an den A-Cluster bindet und so zu einer Fehlbesetzung des aktiven Zentrums während der Enzympräparation führen kann. Durch die Kristallisation der C-terminalen ACS-Domäne wurden hochaufgelöste Strukturen erzeugt, welche eine Diskussion der strukturellen Details des aktiven Zentrums ermöglichen. Verschiedene Konformationen des konservierten Phe515 deuten darauf hin, dass die Reihenfolge der Substratbindung an das proximale Ni (Ni_p) durch Phe515 gesteuert sein könnte. Eine nicht physiologische, verzerrt tetraedrische Koordination des Ni_p unter Beteiligung zweier Imidazolliganden spiegelt möglicherweise den CO- und CH_3 -gebundenen Zustand der ACS wider und veranschaulicht die hohe Flexibilität des A-Clusters.

Summary

Several anaerobic microorganisms, including acetogenic bacteria, sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea operate the reductive acetyl-CoA pathway for autotrophic carbon fixation or to gain energy. The last steps of acetyl-CoA formation rely on three enzymes, the corrinoid-iron/sulfur-protein (CoFeSP), the methyltetrahydrofolate:CoFeSP methyltransferase (MeTr) and the acetyl-CoA synthase/CO dehydrogenase complex (ACS/CODH). MeTr catalyzes the reversible transfer of a methyl group from methyltetrahydrofolate (MeTHF) to Co(I)CoFeSP, generating $\text{CH}_3\text{-Co(III)CoFeSP}$. The latter donates the methyl group to the Ni-Ni-[4Fe4S]-site of ACS/CODH where acetyl-CoA is formed in a condensation reaction together with CO and coenzyme A.

For a better understanding of the reaction mechanisms, MeTr, CoFeSP and the monomeric ACS of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* were heterologously produced in *Escherichia coli* and characterized by biochemical approaches and crystal structure analysis.

Substrate binding to MeTr was investigated by thermodynamic and kinetic measurements. MeTHF binds slightly stronger than the demethylated product tetrahydrofolate (THF), likely following a simple one-step-binding mechanism. When bound to MeTr, the pKa value of MeTHF is increased by 0.2 units at pH 5.6, consistent with an activation mechanism by protonation. The structure of MeTr was solved in apo, MeTHF- and THF-bound states. Met12 und Gln203 facilitate the opening and closing of the substrate binding pocket. The product bound structure shows a conformation of Asn200, which may stabilize a protonated H-N5(+)-CH₃-transition state of MeTHF by hydrogen bonds. Mutational studies show the contribution of the conserved aspartate residues Asp44, Asp76 and Asp161 to substrate binding and activity. Asp44 and Asp76 form a functional dyade but can be excluded as proton donors for substrate activation.

The crystal structure of CoFeSP was refined to a resolution of 1.95 Å, including the previously disordered N-terminal [4Fe4S]-cluster binding domain. The expected conformational change of the corrinoid binding domain was characterized by analyzing the interaction between CoFeSP and its reductive activator (RACo). An approach of the labeled CoFeSP positions in the CoFeSP:RACo complex was observed by Förster resonance energy transfer. Based on the corresponding fluorescence signal, the kinetics of complex formation were measured in solution. Pulsed electron double resonance showed that the labels approach by 11 Å.

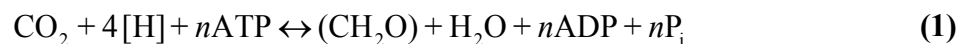
Full-length ACS was purified in the apo state. A reconstitution of the A-cluster with NiCl_2 resulted in active enzyme. Analyzing the binding of metal ions to apo ACS revealed that Zn^{2+} has a higher affinity for the proximal metal-site than the physiological relevant Ni^{2+} . This may explain why ACS can be occupied with the wrong metal ion during enzyme preparation. Different crystal structures of the isolated C-terminal domain of ACS were solved at high resolution. Therefore, structural details of the active site can be discussed. Different conformations of the conserved Phe515 indicate that the order of substrate-binding to the proximal Ni-site (Ni_p) is directed by Phe515. A non-physiological, distorted tetrahedral coordination of Ni_p including two imidazole ligands possibly reflects a CO- and CH_3 -bound transition state of ACS and illustrates the high structural flexibility of the A-cluster.

1 Einleitung

1.1 Autotrophe Kohlenstoff-Fixierung

Kohlenstoffverbindungen sind die Grundlage allen irdischen Lebens. Ca. 50% des Trockengewichts einer Zelle lassen sich auf Kohlenstoff zurückführen [1]. Die Aufnahme von Kohlenstoff zur Synthese organischer Verbindungen wird als Kohlenstoff-Assimilation bezeichnet. Dabei unterscheidet man zwischen autotropher und heterotropher Kohlenstoff-Assimilation. Autotrophe Organismen sind in der Lage, sämtliche organische Verbindungen der Zelle aus anorganischen Stoffen herzustellen. Je nachdem, ob die dafür benötigte Energie aus Licht oder aus reduzierten chemischen Verbindungen stammt, unterscheidet man zwischen Photo- und Chemoautotrophie. Chemotrophe Lebewesen werden weiter in litotroph und organotroph unterteilt, je nachdem ob die chemische Energie aus anorganischen oder organischen Stoffen gewonnen wird [2].

Kohlenstoffautotrophe Organismen, die man bei Pflanzen, Algen, Bakterien und Archaeen findet, fixieren ausschließlich anorganische Kohlenstoffverbindungen (meist CO_2) zum Aufbau von Biomasse. Damit schaffen diese die Existenzgrundlage für heterotrophe Lebewesen, die auf organische Kohlenstoffquellen angewiesen sind. Allgemein lässt sich die endergonische Fixierung von CO_2 in organischem Zellmaterial $(\text{CH}_2\text{O})_x$, die sowohl Reduktionsequivalente als auch Energie benötigt, wie folgt (Gleichung 1) beschreiben [3]:



Jedes Jahr werden ca. 10^{11} Tonnen CO_2 autotroph gebunden [4], was in etwa 10% des in der Atmosphäre vorkommenden Kohlendioxids entspricht. Das macht die biologische Kohlenstoff-Fixierung zum mengenmäßig wichtigsten biochemischen Prozess der Erde. Auch ca. 10^8 Tonnen des toxischen Treibhausgases Kohlenmonoxid (CO) werden jährlich mikrobiell fixiert [5], was entscheidend zum Erhalt einer für den Menschen lebensfähigen Atmosphäre beiträgt.

1.2 Autotrophe CO₂-Fixierung durch den reduktiven Acetyl-CoA-Weg

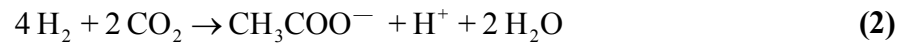
Bislang sind sechs Mechanismen der autotrophen CO₂-Fixierung bekannt [6]: der Calvin-Zyklus, der reduktive Citratzyklus, der Hydroxypropionatzyklus, der 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyratzyklus, der Dicarboxylat/4-Hydroxybutyratzyklus und der reduktive Acetyl-CoA-Weg. Dabei unterscheiden sich die genannten Stoffwechselwege hinsichtlich ihrer Energiebilanz, der beteiligten Enzyme und der gebildeten Stoffwechselintermediate:

Tabelle 1. Übersicht zur autotrophen CO₂-Fixierung (abgeändert nach [6]).

Stoffwechselweg	ATP / gebildetes Pyruvat	Verbrauch an Reduktions-äquivalenten / Pyruvat	CO ₂ -fixierende Enzyme	Aktive CO ₂ Spezies	Gebildete Intermediate zur Biosynthese
Calvin-Zyklus	7	5 NADH (NADPH)	RubisCO	CO ₂	3-Phosphoglycerat, Zuckerphosphate
Reduktiver Citratzyklus	2	2 NADH (NADPH), 2 Ferredoxin, 1 unbekannter Donor	2-Oxoglutaratsynthase	CO ₂	Acetyl-CoA, Pyruvat, PEP, Oxaloacetat, Succinyl-CoA und 2-Oxoglutarat
			Isocitrat-Dehydrogenase	CO ₂	
			Pyruvat-Synthase	CO ₂	
			PEP-Carboxylase	HCO ₃ ⁻	
3-Hydroxypropionat Bizyklus	7	6 NADH (NADPH), 1 FAD wird reduziert	Acetyl-CoA- und Propionyl-CoA-Carboxylase	HCO ₃ ⁻	Acetyl-CoA, Pyruvat und Succinyl-CoA
3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyratweg	9	6 NADH (NADPH), 1 FAD wird reduziert	Acetyl-CoA- und Propionyl-CoA-Carboxylase	HCO ₃ ⁻	Acetyl-CoA und Succinyl-CoA
Dicarboxylat/4-Hydroxybutyratweg	5	2-3 Ferredoxin, 1-2 NADH (NADPH), 1 unbekannter Donor	Pyruvat-Synthase	CO ₂	Acetyl-CoA, Pyruvat, PEP, Oxaloacetat und Succinyl-CoA
			PEP-Carboxylase	HCO ₃ ⁻	
Reduktiver Acetyl-CoA-Weg	~ 1	3 Ferredoxin, 2 F ₄₂₀ H ₂ *	Acetyl-CoA-Synthase / CO-Dehydrogenase	CO ₂	Acetyl-CoA und Pyruvat
			Formylmethanofuran-Dehydrogenase*	CO ₂	
			Pyruvat-Synthase	HCO ₃ ⁻	

* bei Methanogenen

Wie in Tabelle 1 gezeigt, wird beim reduktiven Acetyl-CoA-Weg für die Bildung eines Pyruvats durchschnittlich nur ein Molekül ATP gespalten, was diesen zum energetisch günstigsten Kohlenstoff-Fixierungsweg macht. Aufgrund der sauerstoffempfindlichen Enzyme kann er jedoch nur von strikt anaeroben Mikroorganismen, darunter Acetogene, Sulfat-Reduzierer und Methanogene, genutzt werden, um CO₂ in Acetat umzuwandeln [7–10] (Gleichung 2). Hierdurch werden jährlich weltweit mehr als 10¹⁰ Tonnen Essigsäure gebildet [10].



Dieser nicht-zyklische Stoffwechselweg stellt das biologische Äquivalent zum Monsanto-Prozess dar, bei dem durch den Einsatz von Rhodium-Katalysatoren und harschen Bedingungen (150 - 200 °C, 30 - 60 bar) Essigsäure aus Methanol und Kohlenmonoxid gewonnen wird [11, 12]. Einige Mikroorganismen nutzen den Stoffwechselweg auch in umgekehrter Richtung, um aus der Oxidation von Acetat zu zwei Molekülen CO_2 Energie zu gewinnen. $\text{C}^{13}/\text{C}^{12}$ -Isotopenfraktionierungsmuster deuten drauf hin, dass autotrophe Mikroorganismen mit Hilfe des reduktiven Acetyl-CoA-Weges bereits eine Milliarde Jahre vor Entwicklung der Photosynthese in der Lage waren, CO und H_2 als Energiequelle und CO_2 als Elektronenakzeptor zu verwenden [5].

Wie in Abbildung 1 gezeigt, kann der reduktive Acetyl-CoA-Weg in Methyl- und Carbonyl-zweig unterteilt werden [7, 8]:

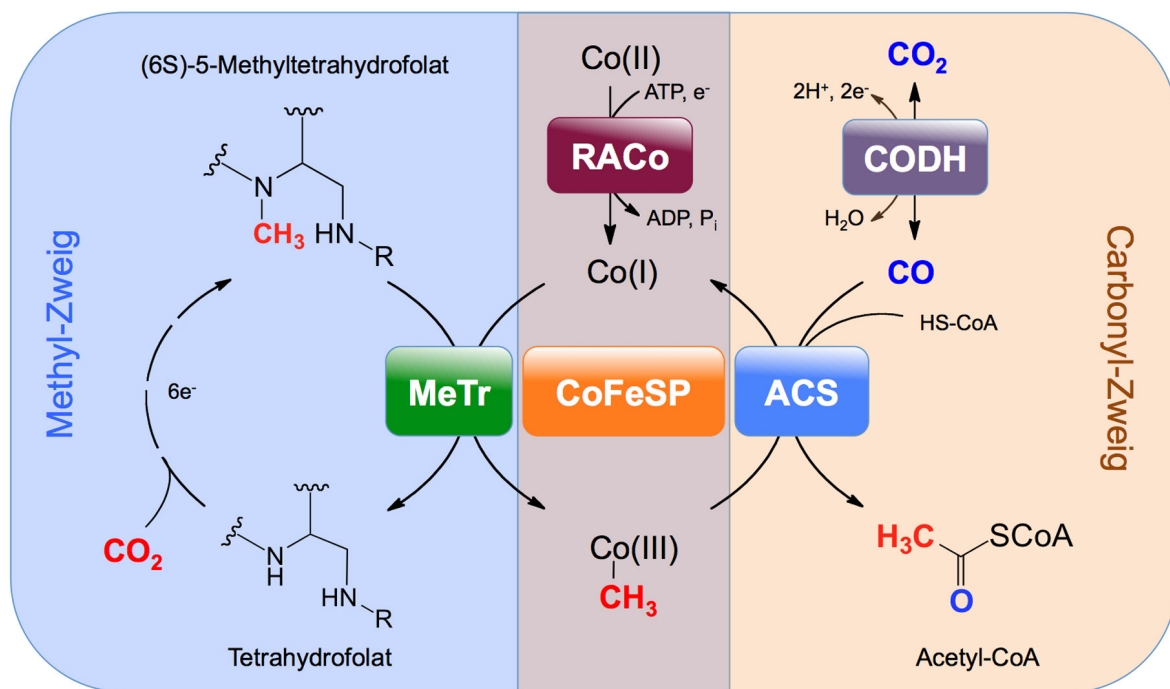


Abbildung 1. Die finalen Schritte der Acetyl-CoA-Bildung. Methyltetrahydrofolat:Corrinoid-Eisen/Schwefel-Protein-Methyltransferase (MeTr) und Corrinoid-Eisen/Schwefel-Protein (CoFeSP) ermöglichen den gerichteten Methylgruppentransfer von (6S)-5-Methyltetrahydrofolat (MeTHF) zum aktiven Zentrum der Acetyl-CoA-Synthase (ACS). Dort entsteht durch Kondensation der Methylgruppe, Coenzym A und der durch CO-Dehydrogenase (CODH) bereitgestellten CO-Gruppe Acetyl-CoA. Der reduktive Aktivator von CoFeSP (RACo) ist für die Reduktion von inaktivem Co(II)CoFeSP zu aktivem Co(I)CoFeSP verantwortlich.

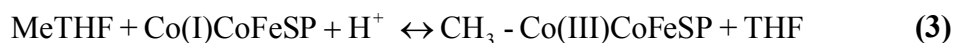
Im **Methyl-Zweig** wird ein Molekül CO₂ durch eine Formiatdehydrogenase zu Formiat reduziert. Dieses kondensiert mit Tetrahydrofolat (THF) in einer ATP-abhängigen Reaktion, die durch 10-Formyl-THF-Synthetase katalysiert wird, zu N10-Formyl-THF. In folgenden Reduktionsschritten wird die Formylgruppe zu einer Methylgruppe reduziert, die schließlich durch eine Methyltransferase (MeTr) auf den Corrinoid-Kofaktor des Corrinoid-Eisen/Schwefel-Proteins (CoFeSP) übertragen wird.

Im **Carbonyl-Zweig** wird ein weiteres Molekül CO₂ durch die CO-Dehydrogenase (CODH) zu CO reduziert. Die Acetyl-CoA-Synthase (ACS) katalysiert schließlich die Kondensation von Carbonylgruppe, Methylgruppe und Coenzym A zu Acetyl-CoA. Die Strukturen und Funktionsweisen der Proteine, die für die letzten Schritte der Acetyl-CoA-Bildung verantwortlich sind, werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

1.3 Proteine der finalen Schritte des reduktiven Acetyl-CoA-Weges

1.3.1 Methyltransferase (MeTr)

MeTr katalysiert, ähnlich zu der ersten Halbreaktion der Methionin-Synthase (MetH) [13], den Transfer einer Methylgruppe von Methyltetrahydrofolat (MeTHF) zu Co(I)CoFeSP, wodurch eine organometallische CH₃-Co(III) Spezies gebildet wird (Gleichung 3).



MeTr aus *Moorella thermoacetica* (MeTr_{Mt}) liegt sowohl in Lösung, als auch im Proteinkristall als Homodimer vor [14, 15] und zeigt je Monomer ein *TIM-barrel*, das im substratgebundenen Zustand MeTHF umschließt [16] (Abbildung 2A). Im Gegensatz zu anderen Enzymen des reduktiven Acetyl-CoA-Weges besitzt MeTr keine Metallzentren oder prosthetischen Gruppen und ist daher nicht sauerstoffempfindlich.

Als erster Schritt des MeTr-Reaktionsmechanismus wurde eine pH-abhängige Konformationsänderung des Enzyms vorgeschlagen [17], wonach MeTHF im unprotonierten Zustand bindet [18]. Für einen effektiven Transfer der Methylgruppe muss das Substrat zunächst aktiviert werden. Dies geschieht vermutlich durch Protonierung der N5-, oder C8α-Position des MeTHF [17, 18], was die Elektrophilie der Methylgruppe steigern würde. Es wird vermutet, dass der aktivierte Übergangszustand durch Wasserstoffbrückenbindungen einer konservierten Asn-Seitenkette (Asn199 in MeTr_{Mt}, Abbildung 2B) stabilisiert wird [16].

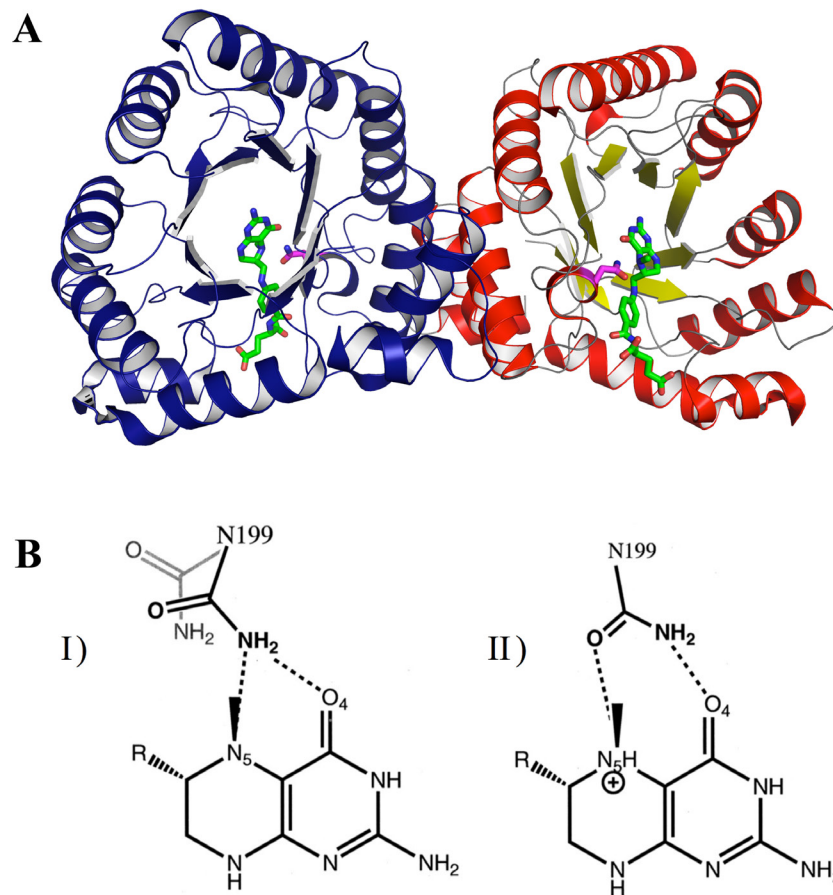


Abbildung 2. Methyltransferase aus *M. thermoacetica*. A) Bänderdarstellung des MeTr Homodimers im Komplex mit MeTHF (PDB-Nummer 2E7F [16]). Das linke Monomer ist blau, das rechte Monomer entsprechend der Sekundärstruktur (α -Helices in rot, β -Faltblätter in gelb und loops in grau) dargestellt. Die katalytisch relevante Asn199-Seitenkette ist pink und MeTHF grün gefärbt. B) Konformationelle Änderungen des Asn199. Die Positionen der Asn199 Seitenkette für apo (grau, PDB-Nummer 1F6Y [14]) und den substratgebundenen Zustand (schwarz) sind in (I) abgebildet. (II) zeigt die hypothetische Position der Asn199 Seitenkette für den vermuteten Übergangszustand mit protoniertem H-N5(+)-MeTHF (entnommen aus [16]).

Für eine Asn199-Ala Mutante wurde bei einer nur 20-fach verringerten Affinität für MeTHF eine 20.000 – 40.000-fach reduzierte katalytische Effizienz beschrieben [16], was für eine essentielle Rolle bei der Stabilisierung des Übergangszustandes spricht. Hierzu müsste Asn199 allerdings von einem „verbrückenden“ Carboxamid-NH₂ (verbrückt O₄ und N5-CH₃ von THF, Abbildung 2B,I) zu einer Konformation wechseln, in der die Aminogruppe als Wasserstoffbrücken-Donor für O₄ und die C=O Gruppe als Wasserstoffbrückenakzeptor für H-N5(+)-CH₃ (Abbildung 2B,II) dienen [16]. Eine derartige Konformation konnte jedoch bislang nicht nachgewiesen werden.

Die aktivierte Methylgruppe wird auf Co(I)CoFeSP übertragen und eine metalloorganische $\text{CH}_3\text{-Co(III)}$ -Spezies gebildet.

1.3.2 Corrinoid-Eisen/Schwefel-Protein (CoFeSP)

CoFeSP bildet das Zentrum des reduktiven Acetyl-CoA-Weges und verbindet den Carbonyl- und Methyl-Zweig. Bei CoFeSP handelt es sich um ein heterodimeres Protein, das sich aus einer kleinen (CfsB) und einer großen Untereinheit (CfsA) zusammensetzt (Abbildung 3A).

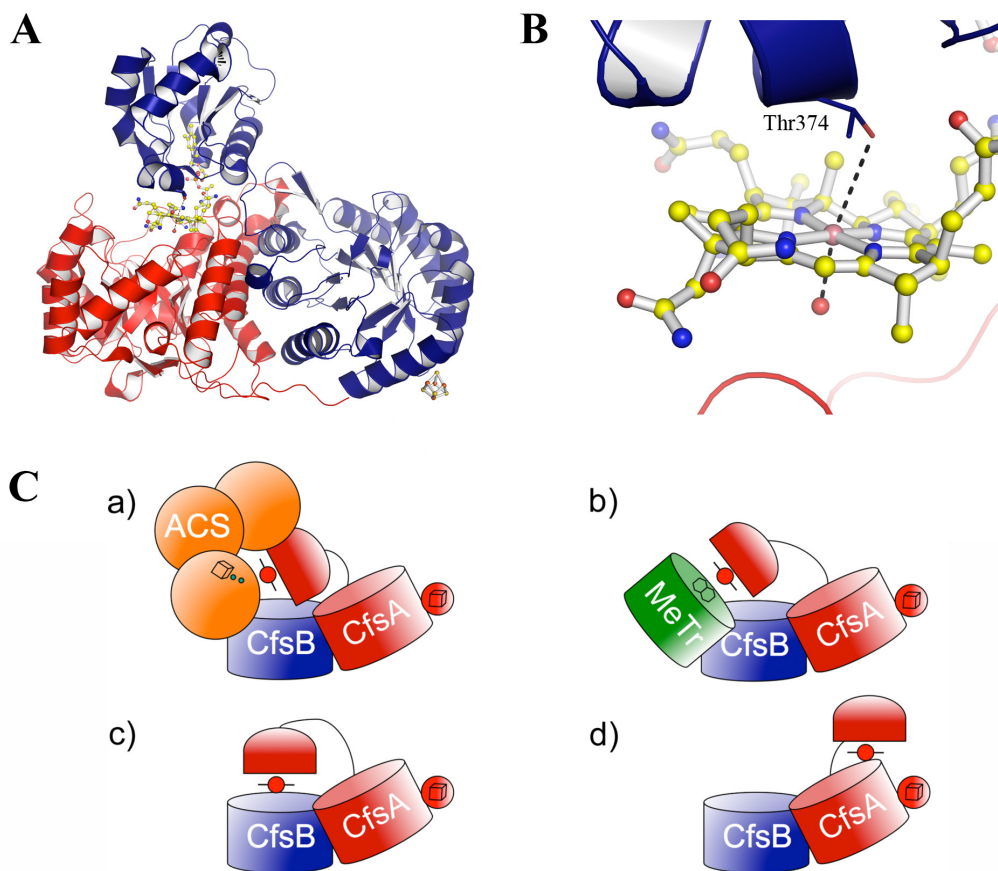


Abbildung 3. Struktur des CoFeSP (PDB-Nummer 2H9A [19], ohne FeS-cluster bindende Domäne). A) Bändermodell des CoFeSP-Heterodimers, bestehend aus CfsA (blau) und CfsB (rot). Der Corrinoid-Kofaktor sowie der [4Fe4S]-Cluster sind als Stäbchenmodelle dargestellt. B) Vergrößerte Darstellung des proteingebundenen Corrinoid-Kofaktors. Während Co vom Tetrapyrrolgerüst und H_2O koordiniert wird, besteht mit Thr374 lediglich eine schwache Wechselwirkung (Abstand: $\sim 3,6 \text{ \AA}$). C) Hypothetische CoFeSP-Konformationen im Komplex mit ACS (a) und MeTr (b), sowie im reaktiven Co(I) bzw. $\text{CH}_3\text{-Co(III)}$ -Zustand (c) oder bei reduktiver Aktivierung (d) (verändert nach [19]).

Die von Svetlitchnaia *et al.* [19] gelöste CoFeSP-Kristallstruktur aus *Carboxydotherrhus hydrogeniformans* (PDB-Nummer 2H9A [19]) zeigt das Protein in der inaktiven

Co(II)-Form, in welcher der Corrinoïd-Kofaktor zwischen CfsB und der C-terminalen CfsA-Domäne eingeschlossen ist (Abbildung 3A). Während CfsB aus einer einzigen Domäne mit $(\beta\alpha)_8$ -barrel Faltung besteht, setzt sich CfsA aus drei Domänen zusammen: Die N-terminale Domäne enthält das [4Fe4S]-Cluster-Bindemotiv CX₂CX₄CX₁₆C und ist über eine *linker*-Region mit der mittleren Domäne verbunden. Diese zeigt wie CfsB eine $(\beta\alpha)_8$ -barrel Tertiärstruktur und ist wiederum über eine 18 Aminosäuren lange, prolinreiche Sequenz mit der C-terminalen Domäne verknüpft. Diese weist eine Rossmann-ähnliche Faltung auf und bindet den Corrinoïd-Kofaktor. Das Co-Ion wird dabei weder vom Dimethylbenzimidazolrest des Corrinoïds („*base-off*“), noch von einer Aminosäure, wie Histidin in MetH („*His-on*“) [13], koordiniert. In der β -Position interagiert Co mit einem Wassermolekül, während α -ständig Thr374 dem Co-Ion mit einem Abstand von ca. 3,6 Å (Abbildung 3B) am nächsten kommt. Diese „*base-off/His-off*“ genannte Konformation führt, verglichen mit einer „*base-on*“ oder „*His-on*“ Stellung [13], zu einem ca. 100 mV positiveren Co²⁺/Co¹⁺-Redoxpotential [20].

Die Rolle des [4Fe4S]-Clusters für den gerichteten Methylgruppentransfer ist unbekannt, zumal die Struktur der [4Fe4S]-Cluster-Bindedomäne aufgrund seiner Flexibilität und der resultierenden Unordnung im Proteinkristall bislang nicht gelöst werden konnte. Lediglich die Position des Clusters konnte aufgrund der anomalen Röntgenbeugung lokalisiert werden [19]. Aufgrund der großen Distanz zwischen Corrinoïd und dem [4Fe4S]-Cluster (~ 52 Å) scheint ein gerichteter Elektronentransfer zwischen beiden Metallzentren, wie von Menon und Ragsdale vorgeschlagen [21], ohne weitreichende Konformationsänderungen unwahrscheinlich. Auch der von beiden Seiten von der Proteinmatrix abgeschirmte Corrinoïd-Kofaktor lässt auf mehrere CoFeSP-Konformationen im Hinblick auf Methylgruppentransfer und reduktive Aktivierung schließen (Abbildung 3C) [19].

1.3.3 Reduktiver Aktivator von CoFeSP (RACo)

Unter *in vitro* Bedingungen wird CoFeSP nach ca. 100 Methylierungszyklen zu inaktivem Co(II)CoFeSP oxidiert [21]. In einer ATP-abhängigen Reaktion kann dieses durch RACo wieder in den aktiven Co(I)-Zustand überführt werden [22].

Die homodimere RACo-Struktur (PDB-Nummer 3ZYY [22], Abbildung 4) kann in vier Bereiche pro Monomer unterteilt werden: Die N-terminale Domäne sorgt mit dem

Cysteinmotiv C38-X5-C44-X2-C47-X29-C77 für die Bindung des [2Fe2S]-Clusters. Eine *linker*-Domäne verbindet die N-terminale und mittleren Domäne, welche maßgeblich für die Dimerisierung des Aktivators verantwortlich ist. Die C-terminale Domäne zeigt, wie für Vertreter der ASKHA-Familie (*acetate and sugar kinases/Hsc70/actin*) [23] typisch, zwei Untereinheiten mit $\beta\beta\alpha\beta\alpha$ -Topologie und wird folglich auch als ASKHA-Domäne bezeichnet. Sie ist vermutlich für die Bindung und Hydrolyse von ATP zuständig [22].

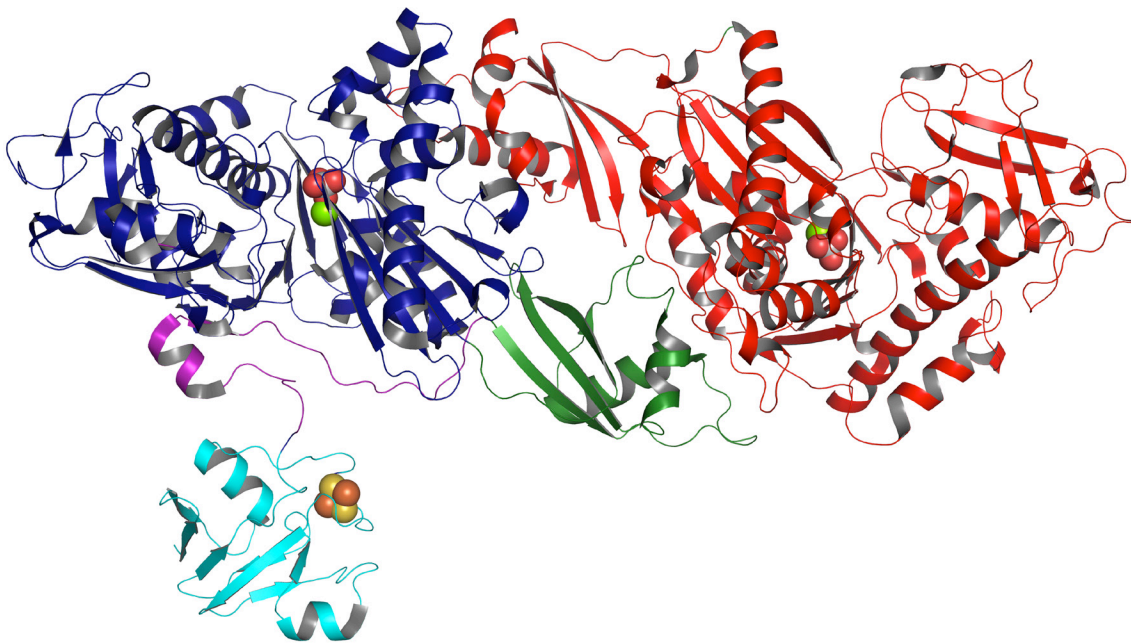
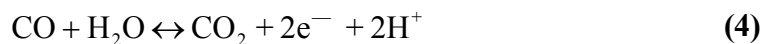


Abbildung 4. Bändermodell des reduktiven Aktivators von CoFeSP. Gezeigt ist die Struktur des RACo-Homodimers (PDB-Nummer 3ZYY [22]), wobei das linke Monomer alle Domänen des Aktivators (N-terminale Domäne: türkise; *linker*-Domäne: violett; mittlere Domäne: grün; C-terminale Domäne: blau) enthält. Mg^{2+} , PO_4^{3-} und der [2Fe2S]-Cluster sind als Kugeln dargestellt, wobei Mg^{2+} grün, Phosphor grau, Sauerstoff rot, Schwefel gelb und Eisenatome orange gefärbt sind. Beim rechten Monomer (rot) ist die N-terminale Domäne in der Kristallstruktur nicht sichtbar.

Die Komplexbildung zwischen RACo und CoFeSP ist selektiv für den Co(II)-Zustand [22] und beeinflusst die Struktur des Corrinoide-Kofaktors [24]. Eine kinetische Analyse der Komplexbildung wurde bislang nicht durchgeführt. Auch ist unklar, welche konformationellen Änderungen mit dem Aktivierungsprozess einhergehen.

1.3.4 Acetyl-CoA-Synthase / CO-Dehydrogenase (ACS/CODH)

CO-Dehydrogenasen (CODHs) katalysieren die reversible Oxidation von CO zu CO₂ (Gleichung 4).



Grundsätzlich unterscheidet man zwischen den Mo,Cu-haltigen CODHs aerober Organismen wie *Oligotropha carboxydovorans* [25] und den Ni,Fe-haltigen CODHs [26–28], die ausschließlich bei Anaerobiern gefunden werden. Nur Letztere sind am reduktiven Acetyl-CoA-Weg beteiligt und lassen sich weiter in mono- und bifunktionelle CODHs unterteilen. Anders als monofunktionelle CODHs bilden die bifunktionellen Enzyme einen Komplex mit Acetyl-CoA-Synthase (ACS/CODH-Komplex) und katalysieren, neben der in Gleichung 4 beschriebenen Reaktion, auch die Bildung von Acetyl-CoA [29] (Gleichung 5):



Die erste Kristallstruktur des bifunktionellen ACS/CODH-Komplexes aus *M. thermoacetica* wurde im Jahr 2002 mit einer Auflösung von 2,2 Å gelöst [30]. Das aktive Zentrum der ACS-Komponente (A-Cluster) zeigte einen [4Fe4S]-Cluster, der mit einem binuklearen Metallzentrum verbrückt war. In der proximalen Position des [4Fe4S]-Clusters wurde ein tetraedrisch koordiniertes Cu-Ion nachgewiesen, wohingegen die distale Position mit einem quadratisch-planar koordiniertem Ni besetzt war. Des Weiteren wurde ein 138 Å langer, hydrophober Kanal beschrieben, der die aktiven Zentren von CODH (C-Cluster) und ACS (A-Cluster) verbindet (Abbildung 5A). Dieser öffnet sich direkt über der proximalen Metall-Position des A-Clusters und dient möglicherweise als Gaskanal für CO [30].

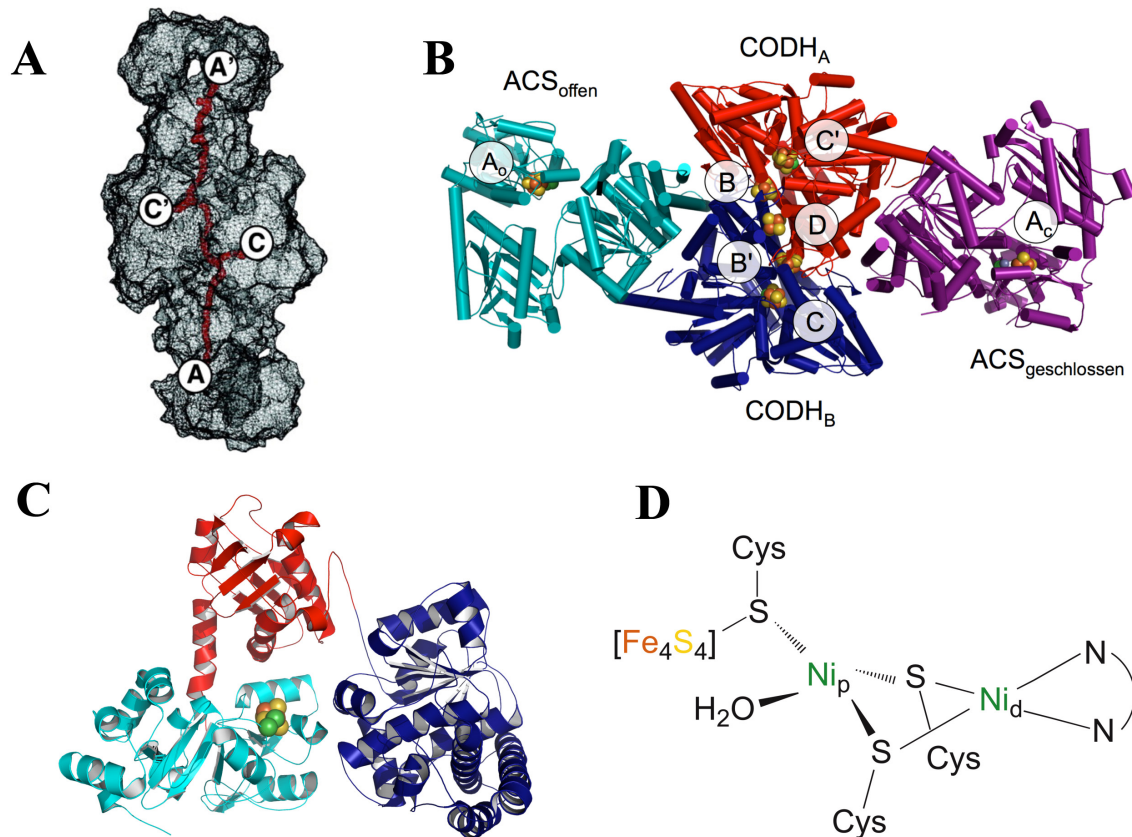


Abbildung 5. Bifunktionaler ACS/CODH-Komplex. A). Hydrophober Kanal des ACS/CODH_{Mt}-Komplexes, entnommen aus [30]. B) Kristallstruktur des ACS/CODH-Komplexes aus *M. thermoacetica* (PDB-Nummer 1OAO [31]). Das zentrale CODH-Homodimer (CODH_A und CODH_B) tritt beiderseits mit je einem ACS-Monomer (ACS_{offen} und ACS_{geschlossen}) in Kontakt. Die FeS-Cluster des CODH-Dimers (B, B', C, C' und D) und der beiden ACS-Monomere (A_o und A_c) sind als Kugelmodelle dargestellt. C) Bändermodell der monomeren ACS aus *C. hydrogenoformans* (PDB-Nummer 1RU3 [32]). Die drei Untereinheiten des Monomers sind blau (N-terminale Domäne), rot (mittlere Domäne) und türkis (C-terminale Domäne) dargestellt. Der A-Cluster ist als Kugelmodell abgebildet. D) Das aktive Zentrum der ACS: ein Ni-Ni-[4Fe4S]-Cluster, abgeändert nach [32].

Bereits wenige Monate später wurde von Darnault *et al.* [31] eine weitere Struktur des ACS/CODH_{Mt}-Komplexes veröffentlicht, bei der die beiden ACS-Monomere unterschiedliche Konformationen und Metallzentren aufweisen. Anstelle des von Doukov *et al.* [30] beschriebenen Cu-Ni-Zentrums zeigt die Struktur in der „offenen“ Konformation (ACS_{offen}) zwei Ni-Atome, bzw. Zn und Ni im „geschlossenen“ Zustand (ACS_{geschlossen}) (siehe Abbildung 5B). Während sich die Zn- und Cu-haltigen Strukturen gleichen, ist im Ni₂Ni-haltigen Monomer der A-Cluster dem Solvens besser zugänglich und der hydrophobe

Kanal sterisch blockiert. Anstelle der tetraedrischen Koordination des proximalen Metallions (Cu bzw. Zn) wurde für Ni eine quadratisch-planare Koordination festgestellt.

Die Annahme, dass nur die binukleare Ni₂Ni-Form katalytisch aktiv ist [31, 33], wurde weiter durch die biochemische Charakterisierung und Kristallstruktur (Abbildung 5C) der monomeren ACS aus *C. hydrogenoformans* [32] gestützt. Wie auch in der von Darnault *et al.* veröffentlichten Struktur wurde hier der A-Cluster als Ni-Ni-[4Fe4S]-Cluster mit quadratisch-planarer Koordination beider Ni-Atome beschrieben. Das proximale Ni (Ni_p) ist über eine Cystein-Seitenkette sowohl mit dem [4Fe4S]-Cluster als auch mit dem distalen Ni (Ni_d) verbrückt. Dieses wird wiederum von zwei N-Atomen des Proteinrückgrats koordiniert (Abbildung 5D).

Obwohl die Struktur und der Aufbau des aktiven Zentrums der ACS bekannt sind, konnte man sich bislang nicht auf einen einheitlichen Mechanismus für die Acetyl-CoA-Bildung einigen. Vor allem in Hinblick auf die Oxidationsstufen der Ni-Atome und der Reihenfolge der Substratbindung werden unterschiedliche Ansätze diskutiert [34]. Bislang ist unklar, ob beide Metallionen des binuklearen Zentrums katalytisch aktiv sind. Eine direkte Beteiligung des reduzierten [4Fe4S]-Clusters an der Acetyl-CoA-Bildung [30, 35] erscheint hingegen unwahrscheinlich, da der Elektronentransfer zum FeS-Zentrum ca. 200-fach langsamer als der Methylgruppentransfer auf ACS ist [36].

Als gemeinsame Grundlage der meisten Mechanismen gilt, dass ACS in der oxidierten [4Fe4S]²⁺-(Ni_p²⁺)-(Ni_d²⁺)-Form inaktiv und im methylierten Zustand diamagnetisch ist [34]. Die CO-gebundene Form des Enzyms zeigt das paramagnetisch NiFeC-Signal und wurde anhand spektroskopischer Analysen [37] als [4Fe4S]²⁺-(Ni_p⁺-CO)-(Ni_d²⁺) beschrieben [38]. Dieser Zustand ist Grundlage des „paramagnetischen Reaktionsmechanismus“, der in Abbildung 6 schematisch dargestellt ist [39]:

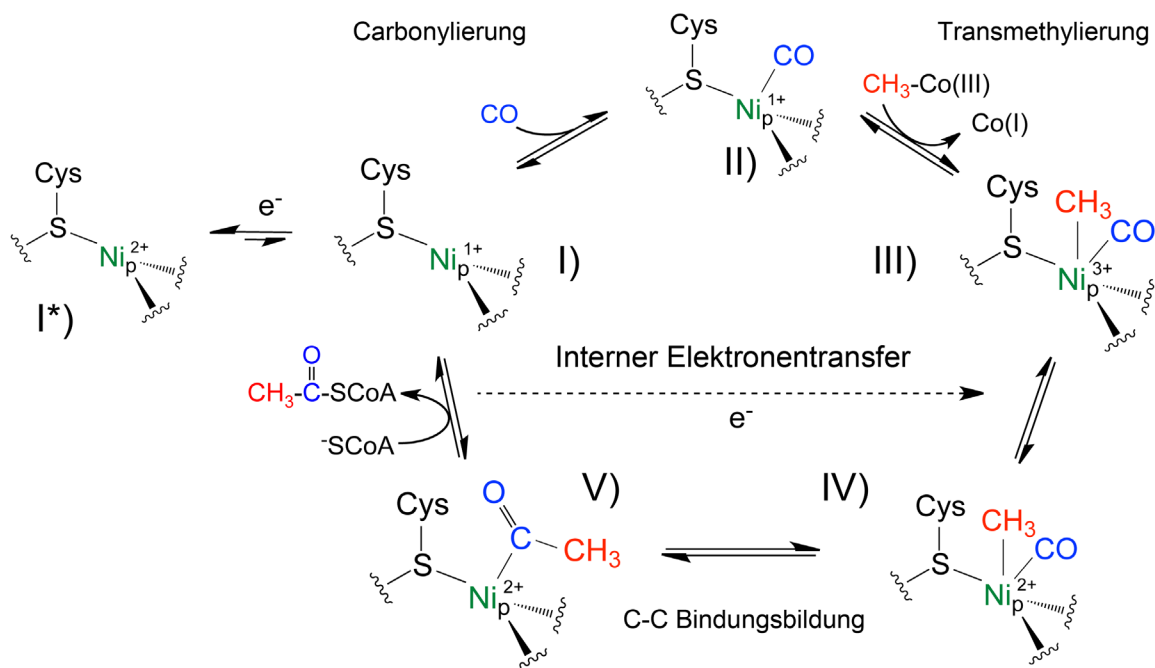


Abbildung 6. Paramagnetischer Reaktionsmechanismus der ACS (modifiziert nach [39]). Details des Mechanismus sind im Fließtext beschrieben. Die Substratbindung geschieht hier in zufälliger Reihenfolge und ist nur zur Vereinfachung mit CO als erstem Substrat dargestellt.

Im Ni^{1+} -Zustand (Abbildung 6, Stufe I), der im Gleichgewicht mit der oxidierten Ni^{2+} -Form steht (Stufe I*), binden CO bzw. das Methylkation in beliebiger Reihenfolge (Stufe II). Durch Transmethylierung entsteht ein instabiler Methyl- Ni^{3+} -Zustand [40] (Stufe III), welcher umgehend zu Ni^{2+} reduziert wird (Stufe IV) und durch Insertion der Carbonylgruppe in ein Acetyl- Ni^{2+} -Intermediat übergeht (Stufe V). Durch den nukleophilen Angriff von CoA kommt es zur Thiolyse der Acetylgruppe, wodurch zwei Elektronen freigesetzt werden. Ein e^- wird zur Regeneration des Ni^{1+} -Zustandes verwendet, wohingegen das andere möglicherweise über einen internen Elektronentransfer zur Reduktion des instabilen Ni^{3+} -Zustandes dienen könnte [39].

Beim „diamagnetischen ACS-Reaktionsmechanismus“ [31, 41] wird davon ausgegangen, dass Ni_p zwischen den Oxidationsstufen Ni^0 und Ni^{2+} wechselt, wodurch ausschließlich ESR-insensitive Zustände durchlaufen werden.

1.4 Reduktiver Acetyl-CoA-Weg in *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*

Das strikt anaerobe, thermophile Bakterium *C. hydrogenoformans* wurde erstmals 1991 aus einer heißen Quelle auf Kunashir Island (Russland) isoliert [42] und dient als Modellorganismus für hydrogenogene Bakterien und Archaeen. *C. hydrogenoformans* ist in der Lage, CO (bzw. CO₂) als alleinige Kohlenstoffquelle und H₂O als Elektronenakzeptor zu nutzen, wobei H₂ und CO₂ freigesetzt werden. Die vollständige Genomsequenzierung [43] zeigte, dass in *C. hydrogenoformans* Z-2901 mindestens fünf unterschiedliche Ni,Fe-haltige CODHs (CODHI-V) vorhanden sind [28, 44].

CODHIII bildet einen funktionellen Komplex mit ACS [32] und ist so vermutlich an der Kohlenstofffixierung über den reduktiven Acetyl-CoA-Weg beteiligt. Die Gene für den ACS/CODH-Komplex befinden sich in Analogie zum *acs*-Operon aus *M. thermoacetica* [45] in einem Gencluster, der für andere Proteine des Stoffwechselweges kodiert (Abbildung 7):

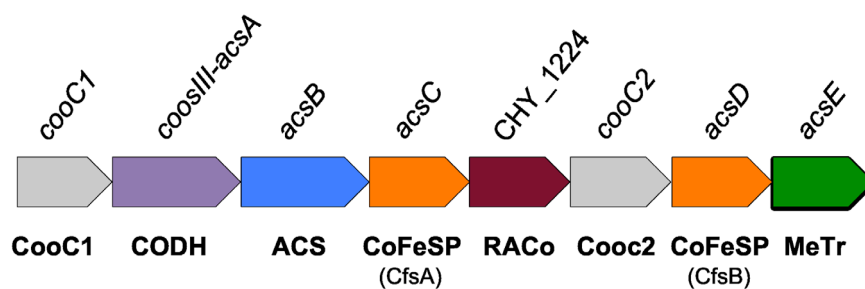


Abbildung 7. *acs*-Gencluster in *C. hydrogenoformans*. CooC1 ist ein ATP-abhängiger Maturationsfaktor der Ni,Fe-haltigen CODH [46, 47]. Die Funktion von CooC2 ist bislang unbekannt.

Bei Wachstumsbedingungen mit hoher CO-Verfügbarkeit existiert ACS in *C. hydrogenoformans* neben dem bifunktionellen ACS/CODH-Komplex auch als funktionelles Monomer [32].

Während CoFeSP und ACS aus *C. hydrogenoformans* bereits strukturell und biochemisch analysiert wurden [19, 32], gibt es bislang keine Untersuchungen zur MeTr_{Ch}.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Der reduktive Acetyl-CoA-Weg ist einer der ältesten und zugleich der energetisch effizienteste Weg der autotrophen CO₂-Fixierung. An den finalen Schritten der Acetyl-CoA-Bildung sind maßgeblich die cobalaminabhängige Methyltransferase (MeTr), Acetyl-CoA-Synthase (ACS) und das Corrinoideisen-Schwefel-Protein (CoFeSP) beteiligt. Obwohl bereits seit mehr als drei Jahrzehnten intensiv an der Aufklärung der strukturellen und biochemischen Grundlagen dieses Stoffwechselweges geforscht wird, ist unser Verständnis über das komplexe Zusammenspiel und die Funktionsweise der beteiligten Proteine noch immer sehr eingeschränkt.

In dieser Arbeit sollten zunächst heterologe Expressionssysteme und Reinigungsstrategien etabliert werden, um ACS, MeTr und CoFeSP aus *C. hydrogenoformans* in aktiver Form zu gewinnen und diese anschließend durch biochemische, spektroskopische und strukturelle Methoden zu charakterisieren.

Insbesondere sollten durch Röntgenkristallographie mechanistische Einblicke in den Methylgruppentransfer und die Substrataktivierung gewonnen werden. Hierzu sollten die vollständige Kristallstruktur von CoFeSP sowie Strukturen von MeTr in substrat- und produktgebundenen Zuständen bestimmt werden.

Zudem sollte die strukturelle Flexibilität von CoFeSP näher untersucht und die Komplexbildung mit RACo anhand konformationeller Änderungen kinetisch verfolgt werden. Da für ACS die Heterogenität des aktiven Zentrums und die für strukturelle Details unzureichend aufgelösten Kristallstrukturen Hindernisse für das mechanistische Verständnis darstellen, sollte die Besetzung des aktiven Zentrums mit divalenten Metallionen untersucht und hochaufgelöste Kristallstrukturen des A-Clusters erzeugt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Anoxisches Arbeiten

Die Proteinreinigung, die biochemische Charakterisierung und die Kristallisation von ACS und CoFeSP fanden in einem anoxischen Handschuhkasten (*model B*, COY Laboratory, Michigan, USA) unter einer Atmosphäre von 95% N₂ und 5% H₂ statt. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) und *stopped-flow* Experimente wurden unter einer reinen N₂-Atmosphäre (LABstar *glovebox*, MBraun, Garching) mit einem maximalen Sauerstoffgehalt von 0,5 ppm durchgeführt.

Um Sauerstoff aus den verwendeten Lösungen und Puffern zu entfernen, wurden diese an einer Vakuum-Gas-Anlage in mindestens vier Zyklen abwechselnd entgast und mit Stickstoff begast.

2.2 Metallfreies Arbeiten

Um eine Besetzung des binuklearen Metallzentrums von ACS und deren C-terminalen Domäne mit Zn²⁺ und anderen zweiwertigen Metallionen zu vermeiden, musste die Reinigung dieser Proteine unter weitestgehend metallfreien Bedingungen durchgeführt werden. Alle verwendeten Glasgefäße, Pufferflaschen und Zentrifugenbecher wurden daher mit konz. HCl und deionisiertem Wasser (*Milli-Q* H₂O) gewaschen. Alle Reinigungspuffer enthielten zudem 2 mM EDTA und 5% (w/v) Chelex 100 (Biorad, München).

2.3 Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Biochemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Biorad (München) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen und besaßen mindestens analytischen Reinheitsgrad. Deazaflavin wurde von Prof. Dr. Kroneck (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt. Die Fluoreszenzfarbstoffe Atto 488 und Atto 590 wurden von AttoTec (Siegen) gekauft. N₂ (99,99%) und N₂ / H₂ (95% / 5%) stammen von Air Liquide (Berlin) und CO von Riessner Gase (Lichtenfels).

Für DNA-Amplifizierung und Mutagenese wurde Phusion DNA-Polymerase von New England Biolabs (Frankfurt/Main) verwendet. Restriktionsenzyme, DNase freies Wasser, T4-DNA-Ligase sowie Kits zur Plasmid-Isolierung wurden von Fermentas (St. Leon-Rot)

bezogen. Kits zur Reinigung von PCR-Produkten und zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen stammen von Qiagen (Hilden).

Die verwendeten Chromatographie-Säulen und Materialien zur Proteinreinigung wurden von GE Healthcare (München) bezogen. RACo wurde von Sandra Hennig (Humboldt-Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt.

2.4 Bakterienstämme

Für die Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten Gene wurde *E. coli* DH5 α mit dem Genotyp F⁻ ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺), *phoA supE44* λ ⁻ *thi-1 gyrA96 relA1* verwendet. Als Expressionsstämme dienten *E. coli* BL21(DE3) mit dem Genotyp F⁻ *ompT gal dcm hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) und *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL mit dem Genotyp F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA* Hte [*argU ileY leuW* Cam^r].

2.5 Antibiotika

Für diese Arbeit wurden folgende Antibiotika mit den angegebenen Konzentrationen verwendet:

- Carbenicillin (Cb), 50 μ g/ml
- Chloramphenicol (Cm), 50 μ g/ml
- Kanamycin (Km), 50 μ g/ml
- Tetrazyklin (Tet), 100 μ g/ml

2.6 Agarose-Gelelektrophorese

50-fach TAE-Puffer: 242 g Tris, 57 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA, ad 1.000 ml H₂O

6-fach Ladepuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau / 0,25% (w/v) Xylencyanol / 30% (v/v) Glycerin

Zur DNA-Isolierung oder Analyse von PCR-Produkten wurden 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet, die GelRed (Biotium) zur Anfärbung der DNA enthielten. Alle Proben wurden mit 6-fach Ladepuffer versetzt und zusammen mit DNA Marker (Gene Ruler, 1kb DNA ladder, Fermentas) auf das Gel aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 90 V angelegt.

2.7 Molekularbiologische Methoden

Die Gene *acsB*, *acsC*, *acsD* und *acsE*, welche für ACS, CfsA (große CoFeSP Untereinheit), CfsB (kleine CoFeSP Untereinheit) und MeTr kodieren, wurden mittels PCR amplifiziert. Dafür wurde der vom DNA-Polymerase Hersteller (New England Biolabs) beschriebene Standardansatz verwendet. Als *template* diente genomische DNA von *C. hydrogenoformans* Z-2901 [43], die von Dr. Jae-Hun Jeoung (Humboldt-Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt wurde. Die PCR-Produkte von *acsC*, *acsD* und *acsE* wurden gemäß der Gebrauchsanweisung des *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen) aus 1%igen (w/v) Agarosegelen isoliert, mit *fast-digest* Enzymen geschnitten und mit T4-DNA-Ligase in pET-Vektoren (Novagen) ligiert. Dabei wurden die Standardprotokolle der Enzymhersteller befolgt.

Für die Amplifizierung von *acsB* und der für die C-terminale Domäne der ACS kodierenden Sequenz (*acsB*, Basenpaare 1.489-2.199) wurde die *polymerase incomplete primer extension* Methode (*PIPE-cloning* [48], modifiziert nach Dr. Martin Bommer, Humboldt-Universität zu Berlin) angewandt. Hierfür kamen genomische DNA von *C. hydrogenoformans* Z-2901 [43], die folgenden Primer mit langen 5'-Überhängen und das in Tabelle 2 beschriebene PCR-Protokoll zum Einsatz:

Vorwärts-Primer der ACS:

5'-CTT GTA TTT CCA GGG CCA TAT GAG CGA AGT TAT TAA TTT TGA TCA AAT TTT TG-3'

Vorwärts-Primer der C-terminalen Domäne:

5'-CTT GTA TTT CCA GGG CCA TAT GGA ATT AAG TGA TGA AGC TGT AGA TAC C-3'

Rückwärts-Primer der ACS / C-terminalen Domäne:

5'-CGA CGG AGC TCG AAT TCG GAT CCT TAG AGT AGT GGC TCC ATG GAA AGA GCT G -3'

Tabelle 2. PCR-Protokoll zur DNA-Amplifizierung für *PIPE-cloning*.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	
Initiale Denaturierung	98	120	
Denaturierung	98	10	} 35 Zyklen
Anlagerung	65	10	
Elongation	72	15 / kb	

Anschließend wurde der *PIPE*-Ansatz mit modifiziertem pET28a-TEV Vektor (bereitgestellt von Dr. Martin Bommer) gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Sowohl die

Ligationsprodukte, als auch die *PIPE-cloning* Ansätze wurden in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert (siehe Abschnitt 2.7.4). Die rekombinanten Plasmide wurden mittels *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) isoliert und anschließend sequenziert (Eurofins MWG Operon, Ebersberg).

2.7.1 Klonierung und Mutagenese von *acsC* und *acsD*

Um ein Koexpressionsplasmid der beiden CoFeSP-Untereinheiten (CfsA und CfsB) zu generieren, wurde der Vektor pETDuet-1 verwendet. Dieser besitzt zwei multiple Klonierungsstellen (MCS1 und MCS2), T7-Promotoren und Ribosomenbindestellen und eignet sich hierdurch zur gleichzeitigen Expression zweier Gene. Zunächst wurde das durch PCR amplifizierte Gen *acsD* mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* geschnitten und in die MCS2 des analog geschnittenen pETDuet-1-Vektors ligiert, wodurch das rekombinante Plasmid pPKacsD entstand. Das Gen *acsC* wurde mit *NcoI* und *NotI* geschnitten und in die MCS1 von pPKacsD ligiert. Das rekombinante Koexpressionsplasmid wurde sequenziert (Eurofins MWG Operon) und als pPKacsCD bezeichnet. Für eine separate Produktion von CfsA wurde *acsC* mit *NcoI* und *NotI* geschnitten und in die MCS1 von pETDuet-1 ligiert, wodurch das rekombinante Plasmid pPKacsC entstand. Zur Erstellung der Mutanten CfsA-C348S/E397C und CfsB-E138C wurde das *QuickChange Site-Directed Mutagenesis*-Protokoll (Stratagen, Santa Clara, USA) befolgt und pPKacsC und pPKacsD als *template* und folgende Primer verwendet:

CfsA-C348S Vorwärts-Primer:

5'-CTC GTT GAC TTA CTT CTC TGT TGC CGG TGA TGT AG-3'

CfsA-C348S Rückwärts-Primer:

5'-CCT TCT ACA TCA CCG GCA ACA GAG AAG TAA GTC AAC GAG AAG-3'

CfsA-E397C Vorwärts-Primer:

5'-GGA AAG CGG AAT TGC TTG CAA AGT TAA CCA CAG AAA AGC-3'

CfsA-E397C Rückwärts-Primer:

5-GCT TTT CTG TGG TTA ACT TTG CAA GCA ATT CCG CTT TCC-3'

CfsB-E138C Vorwärts-Primer:

5'-GGT GTG GAA GAA AAA GAT GCG TGC ATT TTC CCG GTT ATT GGG-3'

CfsB-E138C Rückwärts-Primer:

5'-CCC AAT AAC CGG GAA AAT GCA CGC ATC TTT TTC TTC CAC ACC-3'

2.7.2 Klonierung und Mutagenese von *acsE*

Das *acsE* Gen wurde mittels PCR amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* geschnitten und in den analog behandelten Vektor pET28a ligiert, was zur Produktion einer MeTr mit N-terminalen His₆-tag führte. Das rekombinante Plasmid wurde daher pPKacsE-His genannt. Um MeTr ohne Reinigungs-tag zu erhalten, wurde das mit *NdeI* und *XhoI* geschnittene *acsE* Gen in pET20b ligiert. Das resultierende rekombinante Plasmid wurde pPKacsE genannt. Zur Erstellung der Mutanten D44A, D76N und D161N wurde das *QuickChange Site-Directed Mutagenesis*-Protokoll (Stratagen, Santa Clara, USA), pPKacsE als *template* und folgende Primer verwendet:

D44A Vorwärts-Primer:

5'-GAG AAA GGT GCC CAT TAC TTG GCT GTT AAT ACC GGT CCA ACT GCC-3'

D44A Rückwärts-Primer:

5'-GGC AGT TGG ACC GGT ATT AAC AGC CAA GTA ATG GGC ACC TTT CTC-3'

D76N Vorwärts-Primer:

5'-GTT GAT TTA CCT TGT TGC CTT AAT TCT ACT AAC CCT GAT GCC ATC-3'

D76N Rückwärts-Primer:

5'-GAT GGC ATC AGG GTT AGT AGA ATT AAG GCA ACA AGG TAA ATC AAC-3'

D161N Vorwärts-Primer:

5'-CCT ATG ACT GAG CTT TAT ATT AAC CCT CTT ATT TTG CCG GTA AAC G-3'

D161N Rückwärts-Primer:

5'-CGT TTA CCG GCA AAA TAA GAG GGT TAA TAT AAA GCT CAG TCA TAG G-3'

2.7.3 Klonierung von *acsB*

Das für ACS kodierende Gen *acsB* wurde mittels *PIPE-cloning* amplifiziert und in einen modifizierten pET28a-Vektor mit N-terminalem Strep-tag ligiert. Dem Reinigungs-tag ist eine *Tabacco Etch Virus* (TEV) Protease-Schnittstelle vorgeschaltet, sodass der tag nach erfolgter Proteinreinigung wieder entfernt werden konnte. Das rekombinante Plasmid zur Produktion der ACS wurde als pPKacsB bezeichnet. Das für die 26 kDa große C-terminale Domäne der ACS (Aminosäuren 497-732) kodierende, rekombinante Plasmid wurde pPKacsB_Cterm genannt.

2.7.4 Transformation

Luria-Bertani (LB)-Medium:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB-Agar:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar

Für die Transformation wurden elektro- und chemokompetente *E. coli* Zellen nach Sambrook und Russell [49] hergestellt. Bei der Elektrottransformation wurden 2 µl des rekombinanten Plasmids zu 50 µl der elektrokompenten Zellen gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde durch einen Elektroschock bei 2.500 V erzielt. Anschließend wurden die Zellen mit 950 µl LB-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C inkubiert.

Bei der Chemotransformation wurden 2 µl des rekombinanten Plasmids zu 200 µl der chemokompenten Zellen gegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 45 s ein Hitzeschock bei 42 °C. Hiernach wurden die Zellen für 10 min auf Eis gekühlt, mit 800 µl LB-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Sowohl elektro- als auch chemokompetente Zellen wurden nach der Transformation bei 12.000 g zentrifugiert. Anschließend wurden diese in LB-Medium resuspendiert und auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert oder als Flüssigkulturen in LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.8 Heterologe Genexpression in *Escherichia coli*

LB-Medium:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
Modifiziertes TB-Medium (mTB) [28]	12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 10 ml/l Glycerin
Modifiziertes M9-Minimalmedium [49]	0,1 g/l EDTA, 15 mg/l FeSO ₄ , 0,05 mg/l CuSO ₄ , 1 mM MgSO ₄ , 0,3 mM CaCl ₂ , 0,4% (w/v) Glukose, 1,5 mg/l Thiamin, 1,5 mg/l Biotin, 80 g/l Na ₂ HPO ₄ , 20 g/l KH ₂ PO ₄ , 5 g NaCl, 5 g/l NH ₄ Cl
Additive:	0,1 M FeSO ₄ -Lösung 0,1 M NaS ₂ -Lösung 0,1 M NiCl ₂ -Lösung

Zur heterologen Expression wurden die entsprechenden rekombinanten Plasmide durch Elektro- oder Chemotransformation in Expressionsstämme eingebracht. Vorkulturen in LB-Medium wurden entweder mit Einzelkolonien der Transformationsansätze oder 20 µl des jeweiligen Glycerinstocks angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C kultiviert. Die Hauptkulturen wurden mit 1% (v/v) der Vorkultur gestartet und bis zur Induktion bei 37 °C inkubiert.

2.8.1 Produktion von MeTr

Die rekombinanten Plasmide pPKacsE und pPKacsE-His wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Expressionsstämme wurden in 2 l LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum (Cb, bzw. Km) bei 37 °C kultiviert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer optischen Dichte von 0,7 bei 600 nm durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG. 6 h nach Induktion wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 8.000 rpm und 4 °C geerntet.

2.8.2 Produktion von CfsA, CfsB und CoFeSP

Um das CoFeSP-Heterodimer oder die beiden Untereinheiten (CfsA und CfsB) und deren Mutanten zu erhalten, wurden die rekombinanten Plasmide pPKacsCD, pPKacsC, pPKacsD, pPKacsC-C348S/E397C und pPKacsD-E138C in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Expressionsstämme wurden in 2 l mTB-Medium, welches Cb, 0,2 mM FeSO₄ und 0,2 mM Na₂S enthielt, bei 37 °C kultiviert. Beim Erreichen einer optischen Dichte von 0,7 bei 600 nm wurde die Genexpression mit 0,4 mM IPTG induziert und weiteres FeSO₄ und Na₂S bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben. Die Kulturen wurden für weitere 8 h bei 32 °C inkubiert und schließlich durch 10-minütige Zentrifugation bei 8.000 rpm und 4 °C geerntet.

2.8.3 Produktion von ACS und der C-terminalen ACS-Domäne

Das Plasmid pPKacsB wurde in *E. coli* BL21(DE3) und das Plasmid pPKacsB_Cterm in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Als Kulturmedium dienten jeweils 2 l mTB-Medium in Glasflaschen, welche die entsprechenden Antibiotika, 0,1 mM FeSO₄, Na₂S und NiCl₂ enthielten. Des Weiteren wurde für ACS eine Kultivierung in M9-Minimalmedium durchgeführt. Die Kulturen wurden bei 37 °C im Wasserbad bis zum Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,7 unter Rühren inkubiert und schließlich mit 0,1 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Kulturgefäße mit einem Butylseptum luftdicht verschlossen und ca. 20 h bei 30 °C inkubiert. Um die Zellen unter anoxischen Bedingungen zu ernten, wurden die Zentrifugenbecher ausschließlich im anoxischen Handschuhkasten befüllt und nach 10-minütiger Zentrifugation bei 8.000 rpm und 4 °C geöffnet.

2.9 Zellaufschluss

Aufschlusspuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

Jeweils 5 g Zellen wurden mit 50 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine 15-minütige Ultraschallbehandlung mit einem Branson Sonifier (Mikrospitze, *duty cycle* 50%, *output control* 5). Unlösliche Zellbestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation bei 18.000 rpm oder Ultrazentrifugation bei 35.000 rpm und 12 °C entfernt.

2.10 Reinigung der MeTr

Puffer A:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Puffer B:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Puffer C:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
Puffer D:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 M NaCl
Puffer E:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄

Je nach transformiertem Plasmid (pPKacsE-His oder pPKacsE) konnte MeTr mit oder ohne N-terminalem His₆-tag produziert werden.

Für eine Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie wurde eine 3 ml Ni-sepharose *high performance* (Ni-SHP) Säule mit 30 ml Puffer A equilibriert und mit Proteinelösung beladen. Anschließend wurde die Säule mit 30 ml Puffer A gewaschen und die farblose MeTr-Lösung mit Puffer B eluiert. Imidazol wurde durch Pufferaustausch gegen Puffer C mittels PD-10 Säule entfernt und das gereinigte Protein mit VivaCell 70 Konzentratoren (*cut-off*: 10 kDa) bis zu einer Konzentration von 20 mg/ml konzentriert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Um MeTr ohne Affinitäts-tag zu reinigen, wurde der Überstand nach Zellaufschluss auf eine mit Puffer C equilibrierte DEAE-Sepharose FastFlow Säule (50 ml Säulenvolumen) geladen und mit 400 ml eines linearen Gradienten von 0 - 1 M NaCl mit Puffer D eluiert. MeTr-haltige Fraktionen wurden vereint, mit 1 M (NH₄)₂SO₄ versetzt und für 30 min bei 70 °C inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 10 °C und 18.000 rpm wurde mit dem klaren Überstand eine mit Puffer E equilibrierte Phenyl-Sepharosesäule (20 ml Säulenvolumen) beladen. Die Elution erfolgte durch 200 ml eines linear abnehmenden (NH₄)₂SO₄-Gradienten.

Nach Pufferaustausch gegen Puffer C wurde das gereinigte Protein, wie oben beschrieben, konzentriert und eingefroren.

Bei MeTr-Reinigungen, die für Aktivitätstests mit CoFeSP vorgesehen waren, wurde der Pufferaustausch mit anaerobisiertem Puffer C im anoxischen Handschuhkasten durchgeführt und das Protein in luftdichten Gefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.11 Reinigung des CoFeSP

Puffer A	50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
Puffer B	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 M NaCl
Puffer C	20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl

Der Rohextrakt wurde unter anoxischen Bedingungen auf eine mit Puffer A equilibrierte DEAE-Sepharose FastFlow-Säule (50 ml Säulenvolumen) geladen. Die Elution erfolgte mit 400 ml eines linearen Gradienten von 0 - 1 M NaCl mit Puffer B. Fraktionen, die equimolare Mengen an kleiner und großer Untereinheit auf dem SDS-Polyacrylamidgel zeigten, wurden vereinigt und mit Ammoniumsulfat (Endkonzentration 1 M) versetzt. Anschließend wurde analog zur MeTr-Reinigung eine hydrophobe Interaktionschromatographie mittels Phenyl-Sepharose Säule durchgeführt. Die braune Proteinlösung wurde weiter durch Größenausschlusschromatographie mit Hilfe einer mit Puffer C equilibrierten Superdex 200 *prep-grade* Gelfiltrationssäule gereinigt.

Zur Rekonstitution des Corrinoid-Kofaktors wurde eine equimolare Menge Hydroxocobalamin zu CoFeSP gegeben und über Nacht bei 25 °C unter anoxischen Bedingungen inkubiert. Rekonstituiertes CoFeSP wurde weiter durch Anionenaustausch-Chromatographie an einer mit Puffer A equilibrierten Source 30Q Säule (20 ml Säulenvolumen) gereinigt. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0 - 0,7 M NaCl mittels Puffer B. Nach Pufferaustausch gegen Puffer A wurde das gereinigte Protein, wie oben beschrieben, konzentriert und eingefroren.

Die Reinigung der kleinen CoFeSP-Untereinheit (CfsB) und der CfsB-Mutante E138C erfolgte analog zur CoFeSP Reinigung. Die CfsA-Untereinheit und deren Doppelmutante C348S/E397C konnten nur durch Harnstoff (Endkonzentration 2 M) aus dem mehrmals mit Puffer A gewaschenen Zellpellet gelöst werden. Durch die Zugabe von gereinigtem CfsB und Hydroxocobalamin wurde das lösliche CoFeSP-Heterodimer, bzw. dessen Trippelmutante gebildet.

2.12 Reinigung der ACS und der C-terminalen ACS-Domäne

Puffer A	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl
Puffer B	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2,5 mM Desthiobiotin
Puffer C	50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

Sowohl ACS als auch deren C-terminale Domäne wurden durch Affinitätschromatographie gereinigt. Hierfür wurde eine StrepTactin Sepharose High Performance Säule (Säulenvolumen 20 ml) mit metallfreiem Puffer A equilibriert und mit Rohextrakt beladen. Nach Waschen mit 50 ml Puffer A wurde mit 25 ml Puffer B eluiert. Das gereinigte Protein wurde auf ca. 200 μ M konzentriert und dann 3 Tage bei 45 °C mit 1 mM NiCl_2 in Puffer C rekonstituiert. Überschüssiges NiCl_2 wurde durch Pufferaustausch gegen metallfreien Puffer C mittels Gelfiltration entfernt. Um den Reinigungs-*tag* abzutrennen, wurde TEV-Protease mit N-terminalem Strep-*tag* im molaren Verhältnis 1:100 zum gereinigten Protein gegeben und über Nacht bei 25 °C inkubiert. Ungeschnittenes Protein sowie TEV-Protease wurden durch die StrepTactin Säule entfernt. Protein ohne *tag*, welches nicht mehr an die Säule binden konnte, wurde gesammelt, konzentriert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.13 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford [50]. Um eine Eichgerade zu erstellen, wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Bei MeTr wurde die Konzentration photometrisch anhand der Absorption bei 280 nm und des mit ProtParam [51] ermittelten Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{280} = 25.440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt.

2.14 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel:	12% oder 15% (w/v) Acrylamid
	375 mM Tris/HCl (pH 8,8)
	0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
	0,08% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
	0,05% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Sammelgel:	6% (w/v) Acrylamid 125 mM Tris/HCl (pH 6,8) 0,1% (w/v) SDS 0,08% (v/v) TEMED
Färbelösung:	0,025% (w/v) Coomassie Brillant Blau G250, 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	10% (v/v) Essigsäure
4-fach Probenpuffer:	200 mM Tris (pH 6,8), 8% (w/v) SDS, 0,4% (w/v) Bromphenolblau, 40% (v/v) Glycerin, 400 mM Dithiothreitol
10-fach Laufpuffer:	1,92 M Glycin, 248 mM Tris, 1% (w/v) SDS

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde wie von Laemmli [52] beschrieben durchgeführt. Als Standard dienten 10 µl des *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas) mit β -Galaktosidase (116 kDa), BSA (66,2 kDa), Ovalbumin (45,0 kDa), Lactat-Dehydrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β -Lactoglobulin (18,4 kDa) und Lysozym (14,4 kDa). Die jeweiligen Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt und 10 min bei 100 °C denaturiert. Bei der Elektrophorese wurde eine maximale Spannung von 180 V verwendet. Die aufgetrennten Proteine wurden zunächst mit 0,025% (w/v) Coomassie Brillant Blau G250 angefärbt und die Gele schließlich mit 10% (v/v) Essigsäure entfärbt.

2.15 Analytische Gelfiltration

Um die absolute Molekülmasse der gereinigten Proteine und deren oligomeren Zustand in Lösung zu bestimmen, wurden im anoxischen Handschuhkasten analytische Gelfiltrationsläufe auf einer HiLoad 16/600 Superdex 200 pg-Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Um von den Elutionsvolumina auf die jeweilige Molekülmasse zu schließen, wurde anhand eines Proteingemisches aus Katalase (250 kDa), Aldolase (161 kDa), Conalbumin (75 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa) eine Eichgerade erstellt. Als Laufpuffer diente standardmäßig 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) mit 150 mM NaCl.

2.17 Spektroskopie

2.17.1 UV/Vis Spektroskopie

Absorptionsspektren im ultravioletten und sichtbaren Bereich (UV/Vis) wurden an einem Diodenarray-UV/Vis-Spektrometer (Agilent 8453 Diode Array Spectrophotometer) unter anoxischen Bedingungen bei 25 °C gemessen. Hierfür dienten Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm.

2.17.2 Fluoreszenzspektroskopie

Für Fluoreszenzmessungen wurde ein Spektrofluorometer der Firma Jasco (FP-6500) mit Peltier Temperaturregler (ETC-273T) verwendet. Für sauerstoffempfindliche Proben wurden verschließbare Fluoreszenzküvetten mit Schraubkappen und Silikonsepten verwendet, die im anoxischen Handschuhkasten befüllt und verschlossen wurden.

Um die **Löschung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz der MeTr** durch die MeTHF-Bindung zu untersuchen, wurden 5,5 µM MeTr in 100 mM Tris/HCl (pH 6,7) mit MeTHF (0 - 90 µM) bei 25 °C titriert. Die MeTHF-Konzentration wurde anhand des molaren Extinktionskoeffizienten bei 290 nm ($\epsilon_{290} = 31,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [55]) bestimmt. Die Fluoreszenzspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm im Bereich von 300 - 400 nm aufgenommen. Die Rohdaten wurden um die Eigenfluoreszenz des MeTHF, den Verdünnungsfaktor und den *inner-filter* Effekt (hervorgerufen durch die MeTHF-Absorption) korrigiert. Hierfür wurde die MeTHF-Fluoreszenz bei hohen Konzentrationen (> 20 µM) linear extrapoliert und ein Korrekturfaktor (Quotient aus theoretischer und experimenteller Fluoreszenz) für den jeweiligen Titrationsschritt errechnet. Die Eigenabsorption der MeTr bei 295 nm wurde hierfür vernachlässigt. Zur Anpassung des Fluoreszenzsignals wurde die folgende quadratische Gleichung (6) verwendet [56],

$$A = \frac{A_{\max}}{E \cdot n} \cdot \left(\frac{K_d + n \cdot E + L}{2} - \sqrt{\frac{(K_d + n \cdot E + L)^2}{4} - (n \cdot E \cdot L)} \right) \quad (6)$$

wobei A der Amplitude des Meßsignals, A_{\max} der maximalen Amplitude, E der Enzymkonzentration, L der Ligandenkonzentration, n der Stöchiometrie und K_d der Dissoziationskonstante entspricht.

Die **Kinetik der Substratbindung an MeTr** wurde anhand der Löschung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz mit einem Applied Photophysics SX-20MV *stopped-flow*-System mit gekoppeltem Monochromator und Photoelektronenvervielfacher bei 25 °C gemessen. Hierfür wurden gleiche Volumen an MeTHF (1 - 30 µM) und Enzym (0,4 µM) gemischt und die Abnahme der Fluoreszenz (*cutoff* 320 nm) verfolgt. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. Die Anpassung der Transienten erfolgte mit einer Exponentialfunktion (siehe Gleichung 7):

$$y = a \cdot t + b + \sum_{i=1}^n c_i \cdot e^{-k_i \cdot t} \quad (7)$$

Dabei entspricht y dem beobachteten Signal (hier Fluoreszenz), a der Steigung und b dem *offset* der Basislinie, t der Zeit, i der Anzahl der beobachteten Relaxationen (hier $i = 1$), c_i der Amplitude der i -ten Spezies und k_i der beobachteten Ratenkonstante (k_{obs} -Wert) der i -ten Spezies.

Die k_{obs} -Werte wurden anschließend mit einer linearen (Gleichung 8) und die zugehörigen Amplituden des Fluoreszenzsignals mit einer hyperbolen Funktion (Gleichung 9) angepasst.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{on}} \cdot [\text{MeTHF}] + k_{\text{off}} \quad (8)$$

$$F = \frac{F_{\text{max}} \cdot [\text{MeTHF}]}{K_d + [\text{MeTHF}]} \quad (9)$$

Dabei entspricht k_{obs} der beobachteten Ratenkonstante, k_{on} der Ratenkonstante der Assoziation, k_{off} der Ratenkonstante der Dissoziation, K_d der Dissoziationskonstante, F der Amplitude des Fluoreszenzsignals und F_{max} der maximalen Amplitude.

2.18 Generierung des Co(I)-, Co(II)-, CH₃-Co(III)- und corrinoidfreien CoFeSP

Zur spektralen Charakterisierung wurden von corrinoidfreiem CoFeSP (nach der Reinigung), Protein nach der Rekonstitution des Corrinoid-Kofaktors, von reduziertem und methyliertem CoFeSP Absorptionsspektren im Bereich von 260 - 800 nm aufgenommen. Die Reduktion von Co(II)- zu Co(I)CoFeSP erfolgte, wie von Massey beschrieben [57], durch

Photoreduktion. Der Reaktionsmix enthielt 7,5 μM Co(II)CoFeSP in 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 μM Methylviologen, 5 mM Glycin als Elektronenquelle und katalytische Mengen an 5-Deaza-10-methyl-3-sulfopropylisoalloxazin. Co(I)CoFeSP wurde enzymatisch durch katalytische Mengen an MeTr mit 50 μM MeTHF in 50 mM Na-Acetat (pH 5,0) zu CH₃-Co(III)CoFeSP umgesetzt. Anhand der Absorptionsspektren wurden die jeweiligen Extinktionskoeffizienten für $\lambda = 390 \text{ nm}$ ($\epsilon_{390\text{red}} = 21,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{390\text{met}} = 14,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und $\lambda = 450 \text{ nm}$ ($\epsilon_{450\text{red}} = 3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{450\text{met}} = 12,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ermittelt (siehe Anhang, Abbildung A4). Daraus ergaben sich für den Übergang von reduziertem zu methyliertem CoFeSP $\Delta\epsilon_{450\text{nm}} = 9,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\Delta\epsilon_{390\text{nm}} = 7,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.19 Aktivitätsmessung

2.19.1 Bestimmung der MeTr-Aktivität

Um die *steady-state*-Kinetik der Co(I)CoFeSP-Methylierung zu CH₃-Co(III)CoFeSP durch MeTr und deren Mutanten zu bestimmen, wurde die Absorptionsabnahme bei 390 nm (Co(I)-Signal) und die Zunahme der Absorption bei 450 nm (CH₃-Co(III)-Signal) verfolgt. Der Reaktionsmix enthielt standardmäßig 5 - 10 μM Co(I)CoFeSP in 100 mM Bis-Tris (pH 6,5), 60 mM NaCl und 100 μM MeTHF. Als Reduktionsmittel wurden 160 μM Ti(III)-Citrat, bzw. 100 μM Eu-DTPA zugegeben. Die Reaktion wurde durch verschiedene Konzentrationen an MeTr (20 - 40 nM) gestartet. Für Aktivitätsmessungen der MeTr Mutanten D44A und D76N wurden höhere Konzentrationen an Enzym (11 - 27 μM) und MeTHF (600 μM) verwendet. Der lineare Bereich der Absorptionzunahme bei 450 nm wurde mit Gleichung 10 angepasst und anhand eines $\Delta\epsilon_{450\text{nm}}$ von $9,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ die Co(I)CoFeSP-Methylierungsaktivität von MeTr berechnet.

$$A_{450} = a \cdot t \quad (10)$$

Dabei entspricht A_{450} der Absorption bei 450 nm, a der Reaktionsgeschwindigkeit und t der Zeit.

2.19.2 Bestimmung der ACS-Aktivität

Die spezifische Aktivität der ACS wurde anhand der Acetyl-CoA-Bildung aus CO, Methylcobinamid und CoA bestimmt. Der dafür verwendete Aktivitätstest, sowie die Synthese von Methylcobinamid aus Methylcobalamin basieren auf der von Gencic und Grahame [58] beschriebenen Methode. Der Reaktionsansatz (1,5 ml) mit 50 mM HEPES (pH 7,2), 50 μ M Methylcobinamid, 100 μ M Ti(III)-Citrat, 150 μ l CO gesättigtem Wasser und verschiedenen Konzentrationen an ACS (1 - 5 μ M) wurde 5 min bei 25 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 μ M CoA gestartet und die Co(I)-Cobinamid-Bildung anhand der Absorptionszunahme bei 387 nm verfolgt. Die Anpassung der Daten erfolgte mit einer Exponentialfunktion (siehe Gleichung 7). Die ACS-Aktivität konnte anhand eines $\Delta\epsilon_{387\text{nm}}$ von 17,4 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für den Übergang von $\text{CH}_3\text{-Co(III)-}$ zu Co(I)Cobinamid [59] berechnet werden. Nach ca. 15 min wurden 100 μ l des Reaktionsansatzes entnommen, mit 1 M Na-Citrat (pH 4,0) versetzt und per HPLC (*reversed phase* C18-Säule) bei isokratischer Elution (15% (v/v) Methanol in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 5,3) bei 25 °C auf Acetyl-CoA-Bildung untersucht. Dabei diente eine Probe mit 5 μ M Acetyl-CoA als Referenz.

2.20 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

ITC-Experimente wurden stets bei 25 °C unter anoxischen Bedingungen mit einer MicroCal VP-ITC durchgeführt. Alle hierfür verwendeten Lösungen und Proteinproben wurden vor der Messung temperiert und entgast. Die Datenauswertung erfolgte mit Origin7 (Microcal) und anhand der vom Hersteller der ITC-Apparatur (Microcal) bereitgestellten Bindungsmodelle.

Um die **Substrat- und Produktbindung an MeTr** und deren Mutanten (D44A, D76N und D161N) zu untersuchen, wurden Proteinkonzentrationen von 18 - 78 μ M und Folatkonzentrationen von 0,8 - 2,7 mM verwendet. Diese wurden anhand der molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{290} = 31,7 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für MeTHF; $\epsilon_{297} = 29,1 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für THF [55]) bestimmt.

Für das **Proton-linkage-Experiment** (vorgeschlagen von Dr. Tobias Werther, Humboldt-Universität zu Berlin) wurden je drei Messungen pro pH-Wert (pH 5,6 bzw. pH 7,5) mit verschiedenen Puffersubstanzen durchgeführt, welche sich in ihrer Ionisierungsenthalpie (ΔH_{ion}) unterscheiden (siehe Tabelle 3) [60]:

Tabelle 3. Puffersubstanzen des Proton-linkage-Experiments (modifiziert nach [60]).

Puffersubstanz	pK _s -Wert	Eingestellter pH-Wert	ΔH _{ion} (kJ Mol ⁻¹)
Acetat	4,62	5,6	0,49
MES	6,07	5,6	15,53
ACES	6,75	5,6	31,41
Phosphat	6,81	7,5	5,12
HEPES	7,45	7,5	21,01
Tricin	8,00	7,5	31,97

Dabei wurden MeTr-Konzentrationen von 21 - 78 μM und MeTHF-Konzentrationen von 0,82 - 2,32 μM eingesetzt. Die Ionenstärke aller Puffer wurde auf 100 mM eingestellt. Die durch ITC beobachtete Enthalpieänderung ΔH_{obs} setzt sich aus der intrinsischen Bindungsenthalpie (ΔH_{int}) und ΔH_{ion} zusammen (Gleichung 11) [61],

$$\Delta H_{\text{obs}} = \Delta H_{\text{int}} + n \cdot \Delta H_{\text{ion}} \quad (11)$$

wobei n der Anzahl der gekoppelten Protonen entspricht. So kann durch die Auftragung von ΔH_{obs} gegen ΔH_{ion} anhand der Steigung der Ausgleichsgeraden auf eine Aufnahme (bzw. Abgabe) von Protonen aus dem Solvens geschlossen werden. Die entsprechende Änderung des pK_s-Wertes der protonierbaren Gruppe lässt sich anhand folgender Gleichung (12) berechnen [61]:

$$\Delta n = \frac{K_k \cdot a_{H^+}}{1 + K_k \cdot a_{H^+}} - \frac{K_f \cdot a_{H^+}}{1 + K_f \cdot a_{H^+}} \quad (12)$$

K_k und K_f entsprechen hierbei den Bindungskonstanten der Protonen für den enzymgebundenen (K_k) und freien Zustand (K_f) des Liganden. a_{H^+} beschreibt die Protonenaktivität bei gegebenem pH-Wert und Δn die Anzahl der aufgenommenen Protonen.

Um mittels ITC die **Metallbindung an apo-ACS** zu untersuchen, wurden je 20 μM Protein mit 1 mM NiCl₂- bzw. ZnCl₂-Lösung titriert. Für die **CO-Bindung an ACS** wurden 20 μM rekonstituierte ACS mit CO-gesättigtem Puffer (50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0) titriert. Dabei befanden sich jeweils 1 mM DT in der Messzelle und in der Titrationsspritze.

2.21 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Experimente zur Röntgenkleinwinkelstreuung wurden im Hasylab am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY, Hamburg) durchgeführt. Die Messungen erfolgten an der *beamline* P12, ausgerüstet mit einem Pilatus 2M-Pixel Detektor (Dectris) bei einem Proben-Detektor-Abstand von 3,1 m. Die Auswertung und Prozessierung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm PRIMUS [62]. Streuintensität und Gyrationenradien wurden durch GNOM [63] ermittelt. Zur Berechnung der Molmassen wurde SAXS MoW [64] verwendet. Um *ab initio*-Strukturen der untersuchten Proteine (MeTr, ACS und CoFeSP) zu erzeugen, wurden zunächst mit GASBOR [65] je zehn Modelle anhand der prozessierten Streukurven errechnet und anschließend mit DAMclust [66] gefiltert und gemittelt. Die Abweichung (χ^2) dieser Modelle zu den vorhandenen Kristallstrukturen wurde mit Crysol [67] berechnet.

2.22 Untersuchungen zur strukturellen Flexibilität des CoFeSP

2.22.1 Ortsspezifische Markierung von CoFeSP

PBS-Puffer: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,24 g/l KH_2PO_4

Um konformationelle Änderungen der flexiblen B12-bindenden CoFeSP-Domäne zu verfolgen, wurde CoFeSP ortsspezifisch mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Alle Arbeitsschritte wurden bei gedämpftem Licht gemäß der Gebrauchsanweisung der Farbstoffe (ATTO-TEC) durchgeführt. Zur Kopplung des Akzeptorfarbstoffes ATTO 590 an die kleine CoFeSP-Untereinheit wurden 150 μM CfsB-E138C mit einem 1,5 molaren Überschuss an Cystein-reaktivem Farbstoff bei 25 °C in PBS-Puffer inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Gelfiltration (Superdex 200 *prep-grade*) entfernt. Zur Kopplung des zweiten Farbstoffes an die flexible CoFeSP-Kopfdomäne wurden 2 mg des markierten CfsB-E138C in 0,45 ml PBS-Puffer mit 0,45 ml CfsA-C348S/E397C Pelletsuspension gemischt und mit 0,1 ml einer 2 mM Hydroxocobalaminlösung versetzt. Anschließend wurde 1 ml einer 4 M Harnstofflösung (Endkonzentration: 2 M) zugegeben und 15 min bei 25 °C inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde der Überstand zu einer finalen Harnstoffkonzentration von 0,1 M verdünnt und 200 μM Hydroxocobalamin zugegeben. Nach 1 h wurde der Komplex aus markiertem CfsB-E138C und CfsA-C348S/E397C durch Größenausschlusschromatographie (Superdex 200 *prep-grade*) isoliert. Anschließend wurde

ein 1,5 molarer Überschuss an Donorfarbstoff (ATTO 488) zugegeben und 2 h inkubiert. Nach Gelfiltration wurde die mit ATTO 488 und ATTO 590 ortsspezifisch markierte CoFeSP-Mutante konzentriert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für Kontroll-experimente wurden zusätzlich einfach-markierte CoFeSP-Varianten erzeugt, die entweder mit dem Donor-, oder dem Akzeptorfarbstoff an den entsprechenden Stellen markiert waren. Hierzu wurde zum einen die Kopplung des zweiten Farbstoffs ausgesetzt, wodurch sich nur Akzeptor an CfsB befand. Zum anderen wurde Wildtyp-CfsB ohne reaktives Cystein zur Komplexbildung mit CfsA-C348S/E397C verwendet, wodurch der zugegebene Donor-farbstoff nur an CfsA binden konnte.

2.22.2 Kinetik der Bildung und Dissoziation des CoFeSP:RACo-Komplex

Die Kinetik der Bildung und Dissoziation des CoFeSP:RACo-Komplexes wurde mit einem BioLogic SFM400 *stopped-flow*-System mit Monochromator und Photoelektronen-vervielfacher gemessen. Die Schichtdicke der FC-15 Küvette betrug 1,5 mm und die Temperatur wurde mit einem Wasserzirkulationssystem (Haake SC100-A10) auf 25 °C reguliert. Der FRET-Donor wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm angeregt und das Fluoreszenzsignal des Akzeptors über ein geeignetes Zeitintervall betrachtet. Hierfür wurde ein 590 nm Langpass-Filter (Andover Corporation, Salem, USA) verwendet.

Für **das Komplexbildungsexperiment** wurden konstante Konzentrationen an CoFeSP (0,25 oder 0,75 µM) mit variablen Konzentrationen an RACo (2,5 - 30 µM) gemischt, welches von Sandra Hennig (Humboldt-Universität zu Berlin) bereitgestellt wurde. Dabei erfolgte jede Messung in Dreifachbestimmung. Die biphasigen Progresskurven wurden mit der BioKine Software (BioLogic) unter Verwendung zweier Exponentialfunktionen (Gleichung 7, $i = 2$) angepasst. Die k_{obs} -Werte beider Phasen wurden mit der folgenden, linearen Funktion angepasst (Gleichung 13):

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{on}} \cdot [\text{RACo}] + k_{\text{off}} \quad (13)$$

Die Kinetik **der Komplexdissoziation** wurde durch ein Verdrängungsexperiment bestimmt. Hierzu wurde eine equimolare Mischung aus 1 µM markiertem CoFeSP und RACo in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl mit einem 50-fachen Überschuss an unmarkiertem CoFeSP

gemischt und das Fluoreszenzsignal wie oben beschrieben verfolgt. Die Transienten wurden mit einer einfachen Exponentialfunktion (Gleichung 7, $i = 1$) angepasst.

Die **Simulation der kinetischen Daten** erfolgte mit Hilfe des Programms KinTek Explorer (KinTek Corporation, USA) und in Zusammenarbeit mit Dr. Tobias Werther (Humboldt-Universität zu Berlin). Die der Simulation zu Grunde liegenden, theoretischen Bindungsmodelle wurden von Dr. Tobias Werther vorgeschlagen. Zur Anpassung der simulierten Progresskurven wurde Gleichung 7 verwendet. Die resultierenden k_{obs} -Werte wurden, je nach Fall, mit einer linearen (Gleichung 13) oder hyperbolen Funktion (siehe Gleichung 14) angepasst.

$$k_{\text{obs}} = k_{-2} + \frac{k_2 \cdot [\text{RACo}]}{K_{\text{d1}} + [\text{RACo}]} \quad (14)$$

K_{d1} beschreibt hierbei die Dissoziationskonstante des CoFeSP:RACo-Komplexes.

2.22.3 Abstandsbestimmung durch gepulste Elektronendoppelresonanz

Die Abstandsänderung der beiden markierten CoFeSP-Positionen nach Komplexbildung wurde durch gepulste Elektronendoppelresonanz (PELDOR) ermittelt. Hierzu wurde analog zur Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen MTS (1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl)-methanthiosulfonat als ortsspezifische Spinmarkierungen eingeführt. Die gereinigte CoFeSP-Dreifachmutante bzw. deren Komplex mit RACo, wurden 14 h bei 25 °C mit einem 20-fach molaren Überschuss an MTS inkubiert. Anschließend wurde der Puffer durch eine PD-10 Säule (GE-Healthcare) gegen deuterierten Puffer ausgetauscht, konzentriert und mit deuteriertem Glycerin (Endkonzentration: 50% (v/v)) versetzt. Jeweils 100 µl der MTS markierten Proteinproben wurden in ESR-Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proteinkonzentration der Proben betrug dabei mindestens 100 µM.

Sowohl die ESR-Messung als auch die Auswertung der Daten wurde von Dr. Christian Teutloff (Freie Universität, Berlin) durchgeführt. Die Spektren wurden an einem Bruker Elexsys E3680 Spektrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen. Dieses war mit einer PELDOR-Erweiterung (E580-400U) für die zweite Mikrowellenfrequenz, einem Wanderwellenverstärker (1kW TWT Modell 117, Applied Systems Engineering, Forth Worth, Texas, USA) zur Verstärkung der Mikrowellenpulse und einem Bruker Flexline Md5 Probenkopf ausgerüstet. Die Temperaturregelung erfolgte mit

einem Badkryostaten (Modell C935) und einem Temperaturregler (ITC5) von Oxford Instruments (Oxfordshire, UK). Optimale Aufnahmebedingungen ergaben sich bei einer Temperatur von 40 K, bei der alle weiteren Messungen durchgeführt wurden.

Die Daten wurden mit Hilfe von DeerAnalysis 2013.2 [68], einer Toolbox für Matlab (The Mathworks, Inc., Massachusetts, USA) zur Bestimmung der Abstandsverteilung evaluiert. Zur Anpassung der hintergrundkorrigierten Rohdaten wurde eine Tikhonovregularisierung verwendet. Die Abstandsverteilungen der Spinmarker an den Positionen E138 (CfsB) und E397 (CfsA) wurden anhand der Kristallstrukturen von CoFeSP (PDB-Nummer 2YCL [69]) und des CoFeSP:RACo-Komplexes [70] mit Hilfe von MMM (*Multiscale Modelling of Macromolecular systems*, [71]), einer weiteren Toolbox für Matlab, modelliert.

2.23 Röntgenkristallographie

2.23.1 Kristallisation

Die Kristallisation der gereinigten Proteine erfolgte unter Anwendung des Dampfdiffusionsverfahrens bei 17 °C. CoFeSP, ACS und die C-terminale Domäne der ACS wurden unter anoxischen Bedingungen kristallisiert. Während ACS, deren C-terminale Domäne und MeTr im *hanging-drop*-Verfahren kristallisiert wurden, kam bei CoFeSP die *sitting-drop*-Methode zum Einsatz. Es wurden stets 1,5 µl der jeweiligen Reservoirlösung mit 1,5 µl der Proteinelösung gemischt. Für das *soaking* der MeTr-Kristalle mit Substrat oder Produkt wurden diese für 10 min in Reservoirlösung mit 5 mM MeTHF bzw. THF inkubiert. Um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, wurde den jeweiligen Kristallisationspuffern vor dem Einfrieren der Proteinkristalle 2,3-Butandiol oder Glycerin als Cryoschutzmittel beigemischt. Die Reservoirlösungen, die zu Kristallen mit auswertbaren Datensätzen führten, sind in Tabelle 4 beschrieben.

Tabelle 4. Zusammensetzung der Reservoirlösungen.

Protein	Reservoirlösung
MeTr / Mutanten	0,1 M Tris/HCl (pH 8,5), 2 M Ammoniumsulfat, 5% (v/v) Glycerin
ACS C-term	
Apo	1 M Ammoniumcitrat, 0,1 M Natriumacetat Trihydrat (pH 4,6)
X-Ni	1 M Diammoniumhydrogenphosphat, 0,1 M Imidazol (pH 8,0), 0,2 M NaCl
Ni-Ni	wie bei X-Ni, jedoch metallfreie Puffer mit 5% (w/v) Chelex 100
CoFeSP	33% (w/v) PEG 3350, 0,1 M Na-Acetat (pH 6,1), 10% (v/v) Glycerin, 1 mM DT

2.23.2 Datensammlung und Strukturanalyse

Die Diffraktionsdaten wurden unter Verwendung von Synchrotronstrahlung am Elektronenspeicherring BESSY II, *beamline* BL14.1 und BL14.2 (Berlin, Deutschland) oder DESY, *beamline* MX1 (Hamburg, Deutschland) aufgenommen. Die Einzelkristalle wurden dabei in einem Stickstoffstrom auf 100 K gekühlt. Standarddatensätze wurden, falls nicht anders vermerkt, bei einer Wellenlänge von 0,9184 Å aufgenommen. Des Weiteren wurden für ACS Datensätze auf der höher- und niederenergetischen Seite der Ni-K-Kante (1,4879 Å) aufgenommen. Die initiale Indizierung und Bestimmung der optimalen Messstrategie erfolgte mit dem Programm iMOSFLM [72]. Die aufgenommenen Diffraktionsdaten wurden mit XDS [73] prozessiert und skaliert.

Zur Bestimmung der initialen Phasen wurde die Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell mittels PHASER [74] verwendet. Dabei dienten MeTr aus *M. thermoacetica* (PDB-Nummer 2E7F [14]), CoFeSP ohne N-terminale Domäne (PDB-Nummer 2H9A [19]) und die monomere ACS aus *C. hydrogeniformans* (PDB-Nummer 1RU3 [32]) als Suchmodelle. Für das Erstellen und Verfeinern der Modelle wurden COOT [75], PHENIX [76] und Refmac 5.7 [77] verwendet. Die Statistiken der jeweiligen Datensammlung und Verfeinerung sind im Anhang in den Tabellen A1 - A4 beschrieben. Zur Erstellung von Strukturabbildungen wurde das Programm PyMOL [78] verwendet. Protein-Strukturvergleiche wurden mit DALI [79] durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Die Methyltransferase

3.1.1 Genexpression und Reinigung

MeTr wurde heterolog in *E. coli* BL21(DE3) unter aeroben Bedingungen bei 37 °C produziert. Dabei führten sowohl pPKacsE-His als auch pPKacsE bereits 2 h nach Induktion zu einer deutlichen Überexpression des *acsE* Gens (siehe Abbildung 8, links). Nach 6 h wurden die Kulturen geerntet, was zu einer Nasszellausbeute von ca. 6 g/l führte. Für die Reinigung der MeTr wurden jeweils ca. 10 g Zellen verwendet, aus denen ca. 50 mg MeTr_{His} bzw. 20 mg MeTr ohne Reinigungs-*tag* isoliert werden konnten. Die Reinheit der gereinigten Proteine wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft. Für die Reinheit der MeTr ohne Affinitäts-*tag* (siehe Abbildung 8, rechts) spielte der 30-minütige Hitzeschritt bei 70 °C eine entscheidende Rolle. Während MeTr bei der gewählten Temperatur weitestgehend stabil blieb, fiel ein Großteil der *E. coli* Proteine als amorphes Präzipitat aus.

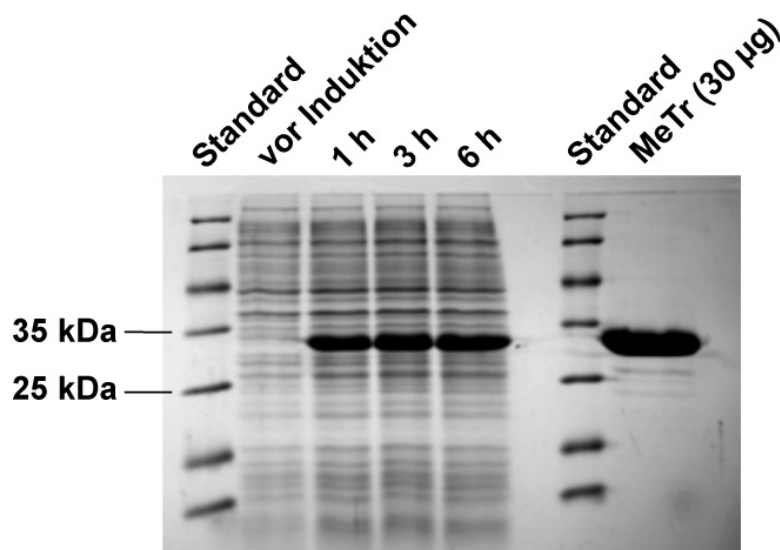


Abbildung 8. Heterologe Expression und Reinigung der MeTr. Das 12%ige (w/v) SDS-Polyacrylamidgel zeigt auf der linken Seite Proben der *acsE* Expression (pPKacsE), die vor Induktion, sowie 1 h, 3 h und 6 h nach Induktion genommen wurden. Rechts wurde das Gel mit 30 µg der ohne *tag* gereinigten MeTr beladen. Als Standard dienten jeweils 10 µl Molekulargewichtsmarker (SM0431, Fermentas).

Die absolute Molekülmasse der gereinigten MeTr konnte anhand der SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese mit Hilfe des Proteinstandards auf ca. 30 kDa abgeschätzt werden, was gut mit dem theoretischen Wert [51] von 29,3 kDa (bzw. 31,3 kDa für MeTr_{His}) übereinstimmt. Die analytische Gelfiltration zeigte einen Elutionspeak nach 83 ml (siehe Anhang, Abbildung A1). Dies entspricht einer Molekülmasse von 52 kDa und weist somit auf ein Homodimer in Lösung hin.

3.1.2 Substrat- und Produktbindung

Isotherme Titrationskalorimetrie. Um die Substrat- bzw. Produktbindung an MeTr mittels ITC zu untersuchen, wurde das Protein in die Messzelle vorgelegt und mit konzentrierter MeTHF- bzw. THF-Lösung titriert (Abbildung 9).

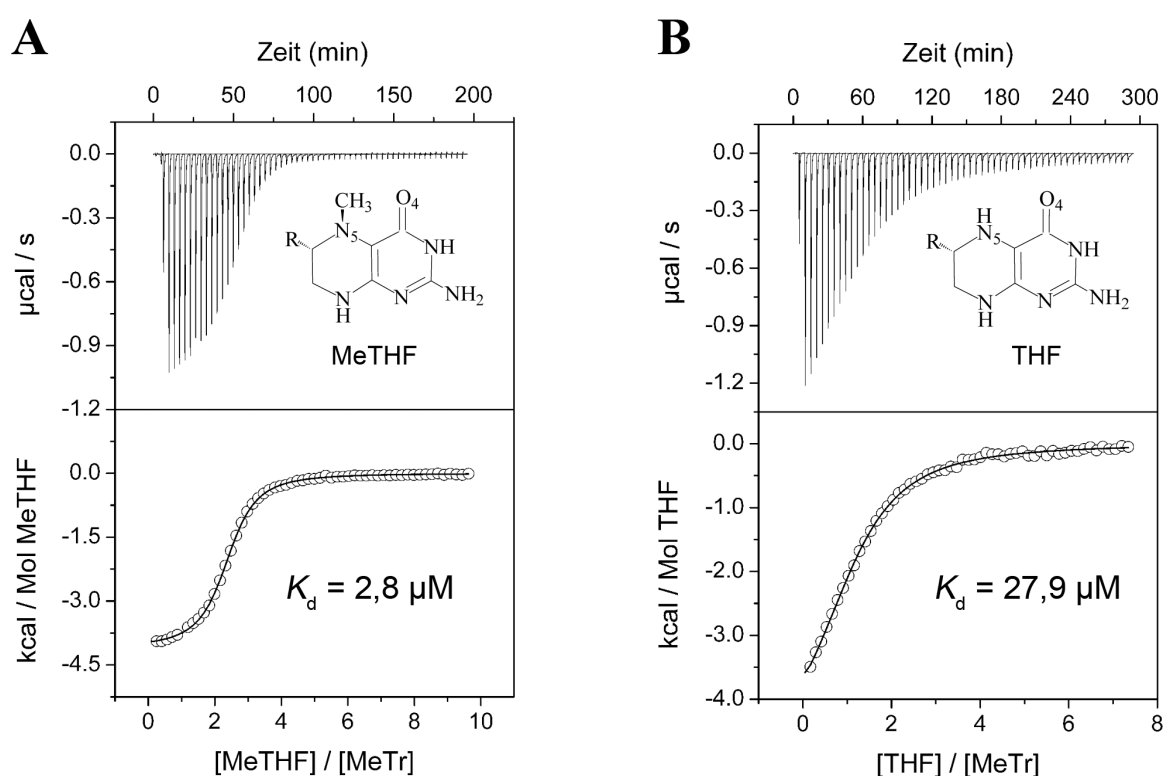


Abbildung 9. ITC-Analyse zur Substrat- und Produktbindung von MeTr. Oben ist jeweils die Wärmeänderung jeder Injektion in Abhängigkeit der Zeit gezeigt. Die Peakflächen wurden integriert, auf die Folatkonzentration normiert und gegen das molare Verhältnis der beiden Interaktionspartner aufgetragen (untere Darstellung). Die durchgezogene Linie repräsentiert die Anpassung der Daten an ein einfaches Bindungsmodell. (A) Titration von 1,47 mM MeTHF zu 33 μM MeTr in 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) und 150 mM NaCl. (B) Titration von 2 mM THF zu 57 μM MeTr in 50 mM MOPS/NaOH (pH 7,2) und 150 mM NaCl.

Die Anpassung der Bindungsisothermen ergab Dissoziationskonstanten von $2,8 \mu\text{M}$ für MeTHF und $27,9 \mu\text{M}$ für THF. Damit zeigt MeTr eine leicht höhere Affinität für das Substrat als für das Produkt, was ein Abdissoziieren des Letzteren nach Abgabe der Methylgruppe begünstigt. Die Bindung von MeTHF bzw. THF an MeTr ist mit $\Delta H = -4,1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ bzw. $-5,1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ enthalpisch getrieben.

Tryptophan-Fluoreszenz. Des Weiteren wurde die Substratbindung analog zu MeTr_{Mt} [18] durch die Löschung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz nach MeTHF Zugabe verfolgt (Abbildung 10). Zhao *et al.* [80] schlugen als Ursache für die Fluoreszenzabnahme eine der Bindung vorgelagerte, strukturelle Umlagerung der MeTr vor, welche die Substratbindestelle und mindestens ein nahegelegenes Tryptophan dem Solvens zugänglicher machen soll.

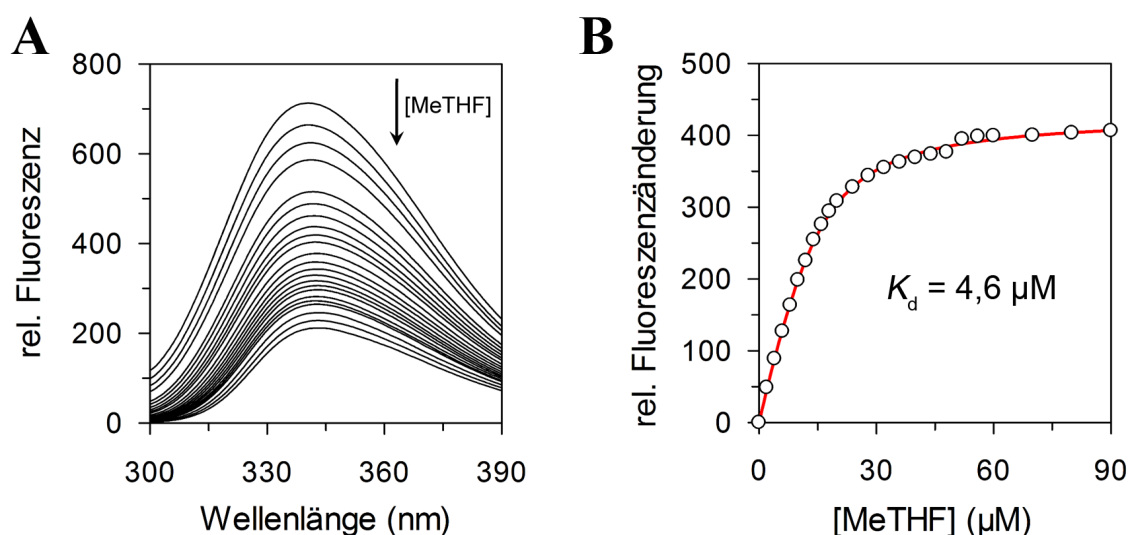


Abbildung 10. Löschung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz in MeTr durch MeTHF. MeTr ($5,5 \mu\text{M}$) wurde mit verschiedenen Konzentrationen an MeTHF ($0 - 90 \mu\text{M}$) titriert und Fluoreszenzspektren im Bereich von $300 - 400 \text{ nm}$ aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm . Die um den Verdünnungsfaktor, *inner filter*-Effekt und MeTHF-Fluoreszenz korrigierten Fluoreszenzspektren sind in A) dargestellt. B) zeigt die relative Fluoreszenzänderung bei 340 nm in Abhängigkeit der MeTHF-Konzentration (Kreise) und die zugehörige Anpassung der Datenpunkte (rote Linie) an eine quadratische Funktion (Gleichung 6).

Auch in MeTr aus *C. hydrogeniformans* nimmt die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz durch die Zugabe an MeTHF ab. Die Anpassung der Fluoreszenzänderungen bei 340 nm führte zu einem K_d -Wert von 4,6 μM für MeTHF, welcher gut mit dem K_d -Wert von 2,8 μM aus dem ITC-Experiment übereinstimmt. Auch für MeTr_{Mt} wurden durch Fluoreszenzlöschung ($K_d = 2,1 \mu\text{M}$) und Gleichgewichtsdialyse ($K_d = 10 \mu\text{M}$) vergleichbare Dissoziationskonstanten für MeTHF ermittelt [18].

3.1.3 Kinetik der Substratbindung

Anhand der beschriebenen Fluoreszenzlöschung konnte auch die Kinetik der Substratbindung an MeTr mittels *stopped-flow*-Technik ermittelt werden. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen an MeTHF mit Enzym gemischt und die Abnahme der Tryptophan-Fluoreszenz verfolgt. Die Anpassung der Progresskurven, welche exemplarisch im Anhang, Abbildung A2 gezeigt ist, erfolgte mit einer Exponentialfunktion (Gleichung 7, $i = 1$). Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten zeigen eine lineare Abhängigkeit von der Substratkonzentration, wohingegen die entsprechenden Amplituden einem hyperbolen Verlauf folgen (siehe Abbildung 11).

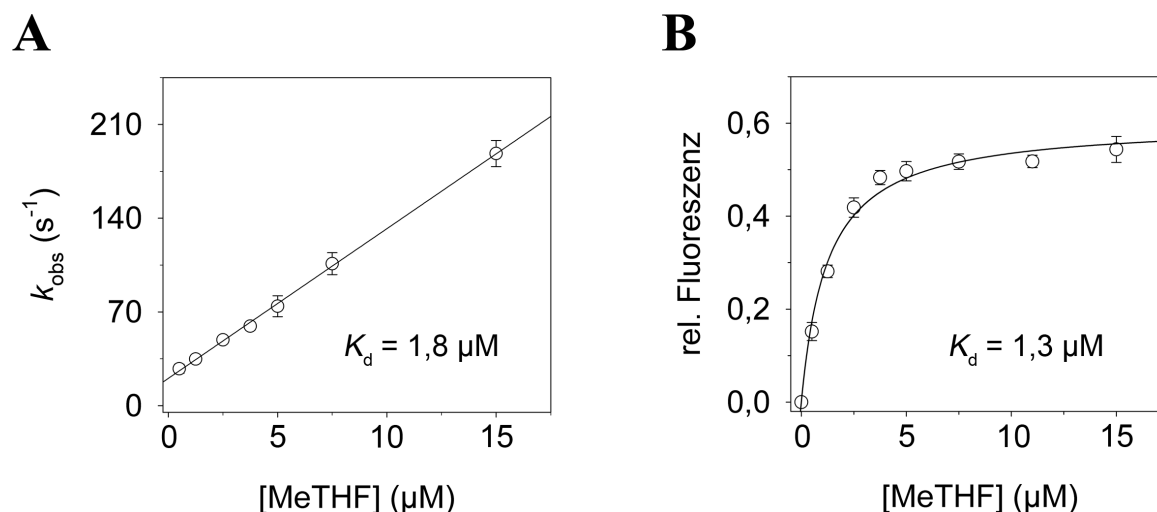


Abbildung 11. Kinetik der MeTHF-Bindung an MeTr. Verschiedene Konzentrationen an MeTHF (0,5 - 15 μM) wurden mit MeTr (0,2 μM) gemischt und die Fluoreszenzänderung (*cut-off* 320 nm) verfolgt. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. Die von der MeTHF-Konzentration abhängigen Geschwindigkeitsraten (k_{obs}) sind in A) gezeigt, wohingegen die jeweiligen Amplituden in B) dargestellt sind. Eine lineare Anpassung (Gleichung 8) der k_{obs} -Werte ergab eine Assoziationsrate von 11,2 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, eine Dissoziationsrate von 20,4 s^{-1} und einen K_d -Wert von 1,8 μM . Die hyperbole Anpassung der Amplituden mit Gleichung 9 ergab einen K_d -Wert von 1,3 μM .

Aus der Anpassung der k_{obs} -Werte und Amplituden ergaben sich nahezu identische K_d -Werte von 1,8 μM und 1,3 μM . Dies spricht, ebenso wie die lineare Abhängigkeit der Raten, für ein einfaches Ein-Schritt-Modell der MeTHF-Bindung an MeTr. Darüber hinaus stimmen die Dissoziationskonstanten auch gut mit den komplementär ermittelten Werten aus ITC ($K_d = 2,8 \mu\text{M}$) und Fluoreszenztitration ($K_d = 4,6 \mu\text{M}$) überein.

Im Folgenden wurde nun untersucht, ob MeTr_{Ch} auch in der Lage ist, die Methylgruppe vom Substrat auf den physiologischen Partner, CoFeSP, zu übertragen.

3.1.4 Methylgruppentransfer auf Co(I)CoFeSP

Der durch MeTr katalysierte Transfer einer Methylgruppe von MeTHF auf CoFeSP wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie analysiert. Hierfür wurde Co(II)CoFeSP (siehe Abschnitt 3.2.2) zunächst chemisch zur aktiven Co(I)CoFeSP-Form reduziert und anschließend die *steady-state*-Kinetik des Methylgruppentransfers anhand der CH₃-Co(III)CoFeSP-Bildung spektral verfolgt (Abbildung 12).

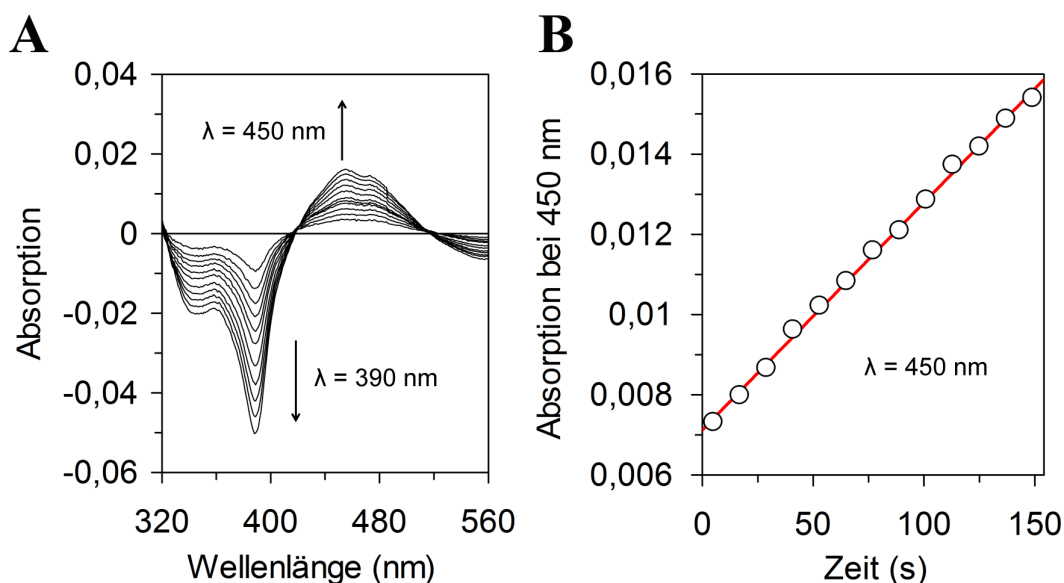


Abbildung 12. Methylgruppentransfer durch MeTr. 5 μM Co(I)CoFeSP wurden durch verschiedene Konzentrationen an MeTr (20 - 40 nM) mit 100 μM MeTHF als Methylgruppendonor methyliert und die spektralen Änderungen (A) photometrisch verfolgt. B) zeigt die zeitabhängige Zunahme der Absorption bei 450 nm sowie die zugehörige Anpassung der Datenpunkte mit Gleichung 10 (rote Linie).

Durch eine lineare Anpassung der Absorptionzunahme bei 450 nm und die vorher bestimmten Extinktionskoeffizienten für Co(I)- und CH₃-Co(III)CoFeSP (siehe Anhang,

Abbildung A4) wurde eine Methylierungsaktivität der MeTr bezüglich Co(I)CoFeSP von $0,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Umsatzrate von $0,24 \text{ s}^{-1}$) berechnet. Somit scheint die Geschwindigkeit des Methylgruppentransfers durch MeTr bei hohen Substratkonzentrationen nicht durch die Substratbindung ($k_{\text{on}} = 11,2 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, siehe Abschnitt 3.1.3) limitiert zu sein. Die berechnete Umsatzrate von $0,24 \text{ s}^{-1}$ ist geringfügig niedriger als die der MeTr_{Mt} ($1,1 \text{ s}^{-1}$) [16], was jedoch vermutlich auf die unterschiedlichen pH-Werte der verwendeten Messpuffer (MeTr_{Ch}: pH 6,5; MeTr_{Mt}: pH 5,0) und nicht auf unterschiedliche Enzymaktivitäten zurückzuführen ist. Sowohl für MeTr_{Mt}, als auch für MetH wurden abnehmende Methylgruppentransfer-Raten bei steigendem pH-Wert beschrieben [81, 82].

Anschließend wurde untersucht, ob das Substrat durch die Bindung an MeTr_{Ch} für den Methylgruppentransfer aktiviert wird.

3.1.5 Substrataktivierung durch Protonenaufnahme

Damit die Methylgruppe von MeTHF abgespalten und auf den Corrinoid-Kofaktor von CoFeSP übertragen werden kann, wurde eine Protonierung des Pterinrings vorgeschlagen, welche die Elektrophilie an der CH₃-N5-Position erhöht [10, 17, 18]. Obwohl der Methylgruppentransfer bei MetH und MeTr_{Mt} scheinbar nach ähnlichen Mechanismen verläuft, wurden hinsichtlich der Protonierung widersprüchliche Ergebnisse beobachtet: Während bei MeTr_{Mt} die Titration mit MeTHF in Gegenwart eines Redox-Farbstoffes eine Protonenaufnahme mit einem pK_s -Wert von $\sim 5,5$ zeigte [18], wurde für MetH eine Protonenabgabe bei der MeTHF-Bindung beschrieben [83] und eine Aktivierung im ternären MetH/MeTHF/Co(I)Cobalamin-Komplex vorgeschlagen [84].

Um zu testen, ob die Substratbindung an MeTr_{Ch} mit einer Protonenaufnahme oder Abgabe gekoppelt ist, wurde ein *proton linkage*-Experiment [85] durchgeführt. Hierfür wurden für zwei pH-Werte je drei Pufferlösungen mit unterschiedlichen Ionisierungsenthalpien hergestellt und die Substratbindung mittels ITC untersucht (siehe Abbildung 13). Dabei kann die Anzahl der vom Solvens aufgenommenen oder abgegebenen Protonen anhand der beobachteten Bindungsenthalpien (ΔH_{obs}) ermittelt werden, welche sich aus der intrinsischen Bindungsenthalpie (ΔH_{int}) und der Ionisierungsenthalpie des Puffers (ΔH_{ion}) zusammensetzen (siehe Gleichung 11). Trägt man ΔH_{obs} gegen ΔH_{ion} auf, so ergibt sich die Anzahl der gekoppelten Protonen (Δn) aus der Steigung der Geraden. Dabei ist jedoch nur die Differenz aller Protonierungs- und Deprotonierungsprozesse während der Substratbindung messbar.

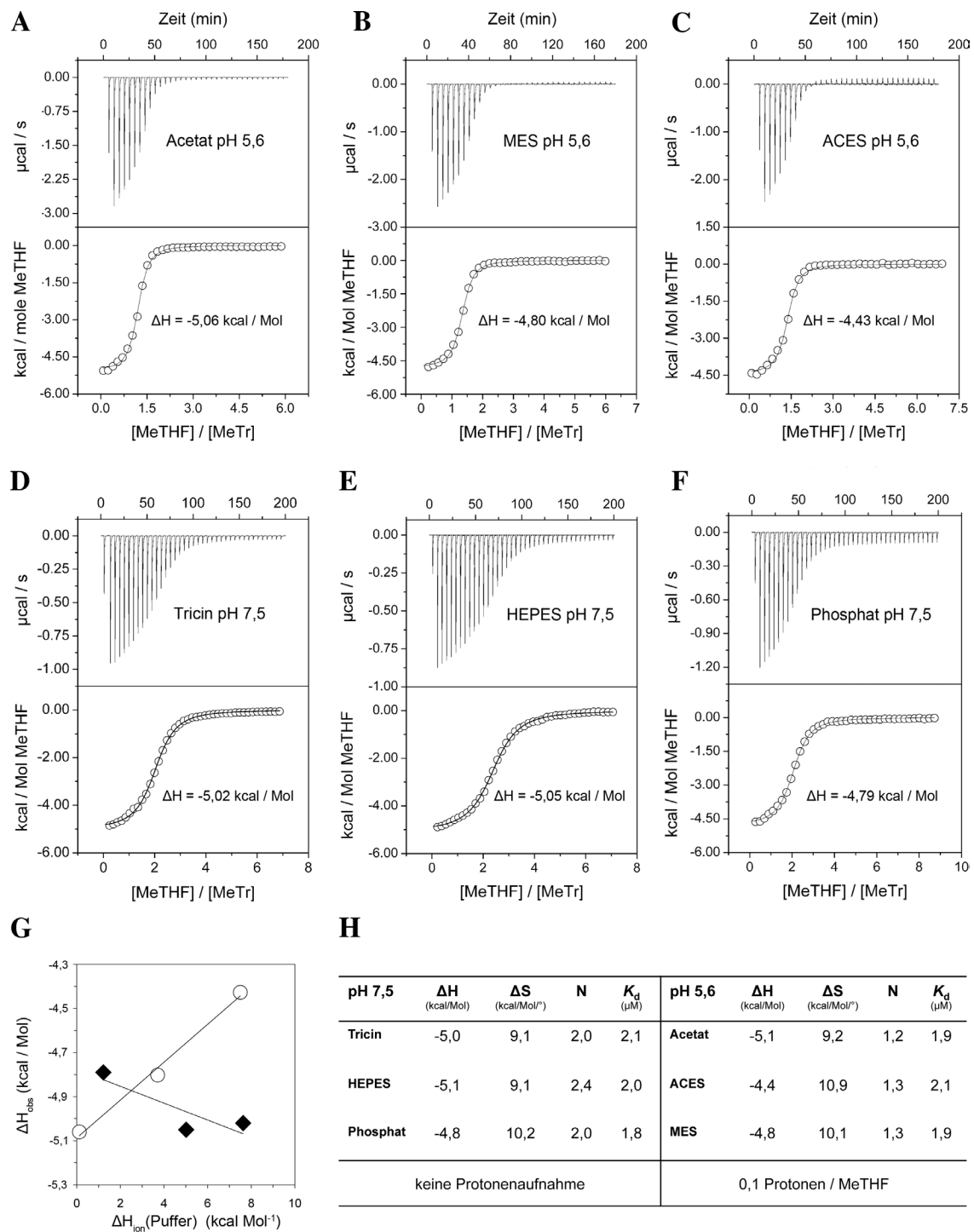


Abbildung 13. Proton linkage-Studie zur Substrataktivierung durch MeTr. Hierfür wurden jeweils drei ITC-Experimente bei pH 5,6 (A, B und C) und 7,5 (D, E und F) unter Verwendung verschiedener Puffer durchgeführt. Oben ist jeweils die Wärmeänderung jeder Injektion in Abhängigkeit der Zeit gezeigt. Die Peakflächen wurden integriert, auf die MeTHF-Konzentration normiert und gegen das molare MeTHF/MeTr-Verhältnis aufgetragen (jeweils untere Darstellung). Die durchgezogene Linie repräsentiert die Anpassung der Daten an ein einfaches Bindungsmodell. G) Auftragung von ΔH_{obs} gegen ΔH_{ion} für pH 5,6 (Kreise) und pH 7,5 (Quadrate). H) Zusammenfassung der *proton linkage*-Studie. Für jedes Einzelexperiment sind die beobachtete Bindungsenthalpie (ΔH), die Entropieänderung (ΔS), die Bindungsstöchiometrie (N) und die Dissoziationskonstante (K_d) angegeben.

Für pH 5,6 wurde anhand Gleichung 11 eine durchschnittliche Aufnahme von 0,1 Protonen pro gebundenem MeTHF berechnet. Verglichen mit der freien Form in Lösung (pK_s -Wert $\sim 5,0$ [81]) ist der pK_s -Wert von MeTHF im enzymgebundenen Zustand gemäß Gleichung 12 um 0,2 Einheiten erhöht. Somit scheint das Substrat bei der Bindung an das Enzym durch Protonierung aktiviert zu werden, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß als für MeTr_{Mt} beschrieben. Für diese wurde eine pK_s -Erhöhung um ca. eine Einheit vorgeschlagen [18]. Auch computergestützte Berechnungen für MeTr_{Mt} weisen auf eine bevorzugte Protonierung der N5-Position des MeTHF im enzymgebundenen Zustand hin, wobei die MeTr-Reste Asp75 (Asp76 in MeTr_{Ch}) und Asp160 (Asp161 in MeTr_{Ch}) wahrscheinlich im deprotonierten Zustand vorliegen [86]. Eine Bindung des Substrates an eine protonierte Form dieser Asp-Reste könnte zu einer Protonenabgabe führen [86], wie sie für MetH beschrieben wurde [83].

Bei pH 7,5 konnte durch das ITC-Experiment keine Protonenaufnahme beobachtet werden. Eine Erhöhung des pK_s -Wertes von MeTHF um 0,2 Einheiten würde bei diesem pH-Wert theoretisch (Gleichung 12) zu einer Aufnahme von 0,002 Protonen pro MeTHF führen, was im Rahmen des Messfehlers durch ITC experimentell nicht fassbar ist.

Wie auch für MeTr_{Mt} und MetH gezeigt [17, 87] scheinen die K_d -Werte für MeTHF unabhängig vom pH-Wert zu sein, was ebenfalls auf eine nur schwache Aktivierung des Substrates durch die Bindung an MeTr_{Ch} hindeutet.

Für ein umfassendes mechanistisches Verständnis der MeTr ist auch eine strukturelle Betrachtung der Substratbindung und Aktivierung unerlässlich. Daher wurden, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, die Kristallstrukturen von MeTr im apo-, MeTHF- und THF-gebundenen Zustand bestimmt.

3.1.6 Kristallisation der MeTr

Die Kristallisation der MeTr erfolgte bei 17 °C unter oxischen Bedingungen mittels Dampfdiffusionsmethode. Hierfür wurden gleiche Volumina an Proteinlösung (20 mg/ml MeTr_{His} in 20 mM Tris/HCl, pH 8,0) und Präzipitanzlösung gemischt (siehe Tabelle 4). Nach 2 bis 3 Tagen bildeten sich farblose Kristalle mit einem Durchmesser von ca. 0,3 mm (Abbildung 14). Substrat- und produktgebundene Zustände von MeTr wurden durch *soaking* der Kristalle mit MeTHF- bzw. THF-Lösung erzeugt.

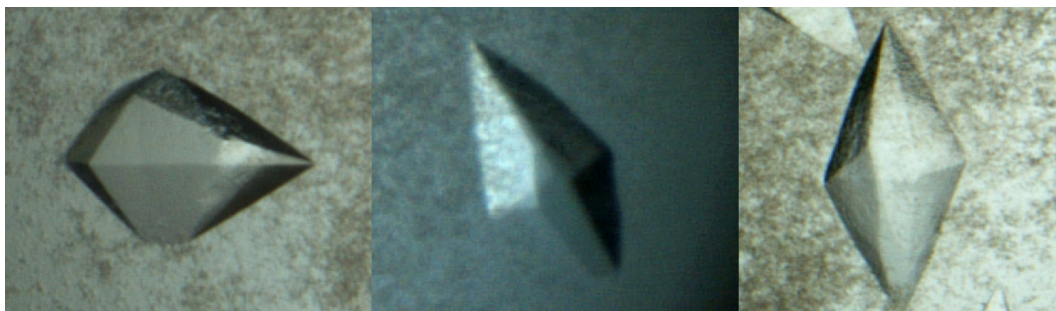


Abbildung 14. MeTr-Kristalle. Die Kristallisation erfolgte im *hanging drop*-Verfahren unter aeroben Bedingungen bei 17 °C in 0,1 M Tris/HCl (pH 8,5), 2,0 M Ammoniumsulfatlösung und 5% (v/v) Glycerin.

3.1.7 Die Kristallstruktur der MeTr

Gesamtstruktur. Die Strukturen der apo, MeTHF- und THF-gebundenen MeTr wurden mittels Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell (MeTr_{Mt}: PDB-Nummer 2E7F [16]) bestimmt. Die Statistiken der jeweiligen Diffraktionsdaten und Strukturverfeinerung sind im Anhang, Tabelle A1, zusammengefasst. Strukturell sind MeTr aus *M. thermoacetica* (PDB-Nummer 2E7F [16]; DALI *Z-score*: 43,0), Cobalamin-abhängige Methionin-Synthase aus *Thermotoga maritima* (DALI *Z-score*: 33,3; PDB-Nummer 3BOF [88]), Dihydropteroat-Synthase aus *Bacillus anthracis* (DALI *Z-score*: 23,6; PDB-Nummer 3H2M [89]) und die kleine Untereinheit von CoFeSP_{Ch} (DALI *Z-score*: 21,4; PDB-Nummer 2H9A [19]) der MeTr_{Ch} am ähnlichsten.

Die MeTr-Struktur weist ein Monomer pro asymmetrischer Einheit auf, das mit seinem symmetrieverwandten Molekül ein Dimer bildet. Jedes Monomer zeigt dabei eine ($\beta\alpha$)₈-barrel-Faltung. Die 8 β -Stränge sind dabei von 8 α -Helices umgeben (siehe Abbildung 15). Die gleichmäßige Verteilung der niedrigen *B*-Faktoren (Abbildung 15, rechtes Monomer) spricht für eine hohe innere Ordnung der MeTr.

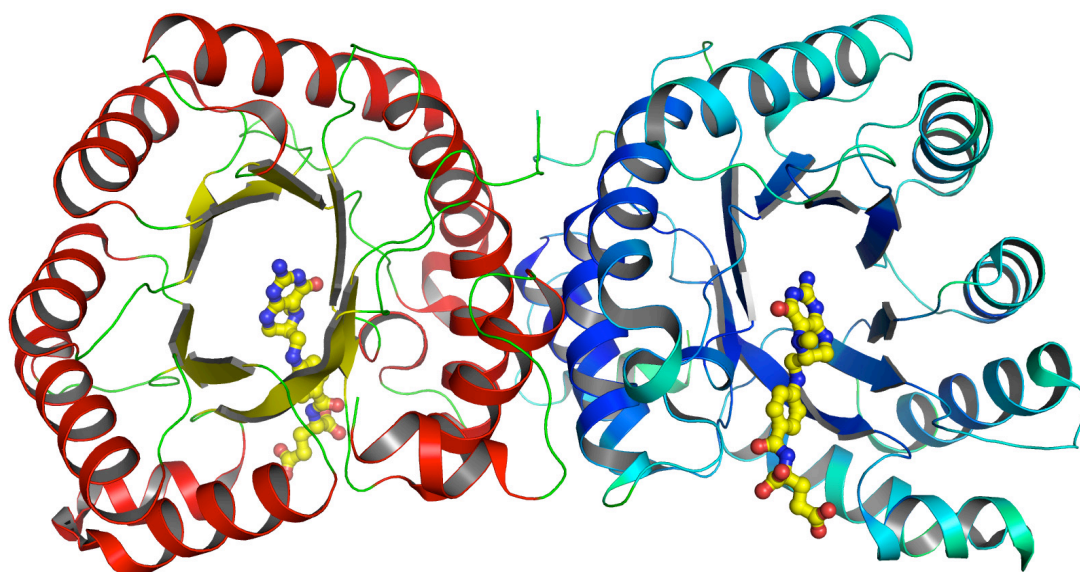


Abbildung 15. Struktur des THF-gebundenen MeTr-Dimers (PDB-Nummer: 2YCJ [69]). Das linke Monomer ist entsprechend der Sekundärstruktur (α -Helices in rot, β -Faltblätter in gelb und *loops* in grün) dargestellt. Das rechte Monomer ist entsprechend der *B*-Faktoren (von blau über grün zu rot zunehmend) gefärbt. THF ist als Stäbchenmodell gezeigt (Kohlenstoffatome gelb, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome blau).

Bezogen auf die Gesamtstruktur unterscheiden sich die MeTHF- und THF-gebundenen Strukturen kaum von der apo MeTr, was sich in niedrigen *r.m.s.*-Abweichungen bezüglich der C_α -Atome von 0,23 Å bzw. 0,32 Å (bezogen auf Monomere) widerspiegelt. Es lassen sich keine großen strukturellen Umlagerungen durch die Substratbindung erkennen, die wie von Zhao und Ragsdale [80] vorgeschlagen, zur Abnahme der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz führen sollten. Wie in Abbildung 16 gezeigt, besitzt jedes MeTr_{Ch}-Monomer drei Tryptophanreste (Trp31, Trp60 und Trp104). Der aromatische Indolring (Atom C7) des Trp31 kommt dabei mit einem Abstand von 9,5 Å (bzw. 8,9 Å) der Carboxylgruppe des Glutamatrestes von MeTHF (bzw. THF) am nächsten. Wie die Gesamtstrukturen, bleiben auch die Konformationen der Tryptophanreste, welche sich alle auf der gegenüberliegenden Seite der Dimer-Kontaktfläche befinden, durch die Substrat-, bzw. Produktbindung annähernd unverändert.

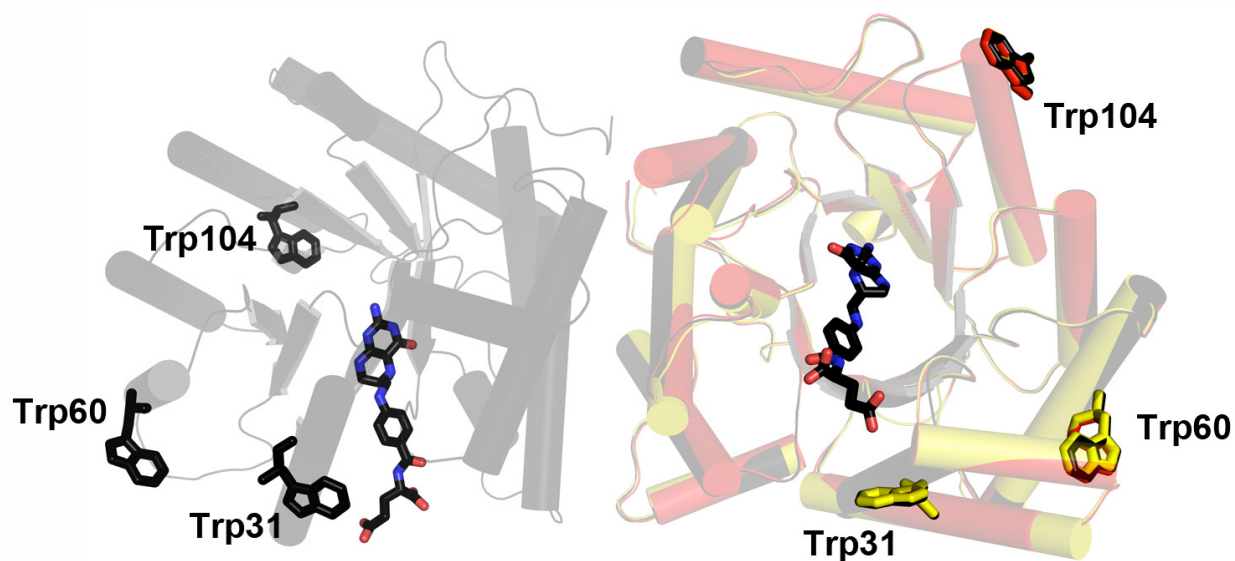


Abbildung 16. Tryptophanreste des THF-gebundenen MeTr-Homodimers. Das rechte Monomer der THF-gebundenen MeTr-Struktur (PDB-Nummer 2YCK [69], schwarz) ist mit der apo- (PDB-Nummer 2YCI [69], gelb) und MeTHF-gebundenen Struktur (PDB-Nummer 2YCJ [69], rot) überlagert, wobei Tryptophanreste und THF als Stäbchen dargestellt sind.

MeTHF-Bindung. In der MeTHF-gebundenen Struktur sind, verglichen mit der apo-Struktur der MeTr, 12 Wassermoleküle im aktiven Zentrum durch das Substrat verdrängt. Geladene Seitenketten auf der Proteinoberfläche bilden die MeTHF-Bindetasche (Abbildung 17A). Dabei sind sechs unter Methyltransferasen und Dihydropteroat-Synthasen konservierte Aminosäuren (Arg208, Gln203, Asn200, Asp161, Asn97, Asp76, siehe Aminosäuresequenzvergleich in Abbildung 18) und fünf Wassermoleküle (W1-W5) direkt am Wasserstoffbrückennetzwerk um das Substrat beteiligt. Des Weiteren interagieren Gly197, Ile164 und Asn10 über Wassermoleküle mit dem Substrat.

Die elektrostatische Oberflächendarstellung der Substratbindetasche (Abbildung 17B) zeigt, dass die basischen Gruppen des Tetrahydropteroyl-Restes von negativer Ladung umgeben sind. Der Glutamatrest des MeTHF wird hingegen von positiver Ladung an der Öffnung der Bindetasche stabilisiert. Die Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Pterinring bzw. dem *p*-Aminobenzoylrest des MeTHF sind bei MeTr_{Ch} und MeTr_{Mt} [16] sehr ähnlich.

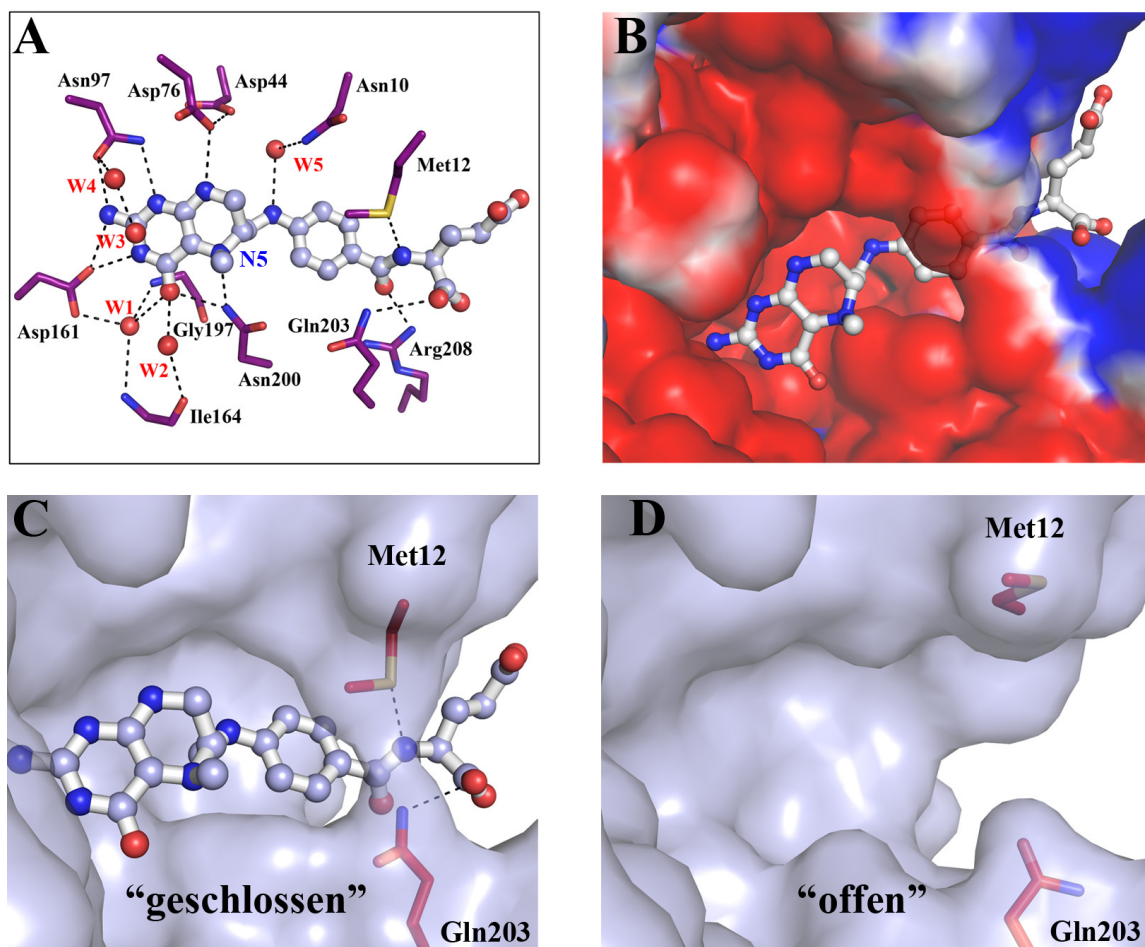


Abbildung 17. Das aktive Zentrum der MeTr. A) Substratbindung im aktiven Zentrum der MeTr. MeTHF und Aminosäurereste, die mit dem Substrat interagieren, sind als Stäbchenmodelle dargestellt. Interagierende Wassermoleküle sind als rote Kugeln abgebildet und mit W1-5 beschriftet. B) Elektrostatische Oberflächendarstellung der Substratbindetasche, erstellt mit dem PyMOL Plug-in APBS [90]. Die Proteinoberfläche ist entsprechend der elektrostatischen Ladung von rot (negativ) über weiß (neutral) zu blau (positiv) gefärbt. C) Geschlossener Zustand der MeTHF-gebundenen Substratbindetasche. MeTHF, sowie die für das Schließen der Bindetasche verantwortlichen Aminosäure-Seitenketten (Met12 und Gln203) sind als Stäbchenmodelle dargestellt. D) Offener Zustand der Substratbindetasche (apo MeTr).

Jedoch zeigen sich Unterschiede bei der Interaktion mit dem Glutamatrest des Folats. Dieser bildet in MeTr_{Ch} Wasserstoffbrücken mit Met12 (Distanz 2,9 Å) und Gln203 (Distanz 3,4 Å) aus, wodurch sich eine „geschlossene“ Konformation der Substratbindetasche ergibt (Abbildung 17C). Ohne Substrat liegen Met12 und Gln203 in einer dem Solvens zugewandten Konformation vor. Hierdurch ist die Substratbindetasche „offen“ (Abbildung 17D) und zugänglich für MeTHF.

MeTr_Ch	MFIMIGERINGMFKDIREALNKDPRPIQEWARRQAEKGAHYLDVNTGPTA--DDPVRVM	58
MeTr_Pt	-MELIGERINGMFKDVKEAILNRDPGPVEYWARRQTENGAGYLLDSTGPAVPPEEQPAAM	59
MeTr_Ad	-MLLIGERINGMFRDIREAIMKRDPPIKKHAILQTQGGARYLDINTGPAVPPEEQPEVM	59
MeTr_Mt	-MLIIGERINGMFGDIKRAIQERDPAVQEWARRQEEGGARALDLNVGPV--QDKVSAM	57
DHPS_Tp	MFEIIGERINGLFTDIREAIANKDPKPIQQWAVKQAEKGAAWLLDINTGPISSEEQAQEV	60
DHPS_Dk	-MILIGERINGMFKDIREALNKDPEPVRYWAKRQYENCAAYLDINTGPTVDPKQPAVM	59
DHPS_Aa	-MIIIGERINGMFNDIGEAIKNEDPEPIQEWAVKQVEAGADYLDANVGPAV--EDSPEVM	57
DHPS_Dt	-MLIIGEKINVMKQIGQAMKDRDKPIQDLAVSQVQAGANALLINAGPAT--KNGPEIM	57
	: :***:* : : : .*: .*. * : * ** ..** : : *	
MeTr_Ch	EWLVKTIQEVVDLPCCLDSTNPDAIEAGLKVHRGHAMINSTSADQWKMDIFFPMAKKYEA	118
MeTr_Pt	EWLVKVAQSASPLPCCLDSTSPDAIEAGLKVHRGRAIINSTSADQWRMDVYFPMVAVKYGA	119
MeTr_Ad	AWLVQVAQEVSPPLPCCLDSTNPEAIEAGLKVHRGKAIINSTTADPWKMEIYFPMVAVKYGA	119
MeTr_Mt	EWLVEVTQEVSNLTLCLDSTNIKAI EAGLKCKNRAMINSTNAEREKVEKFLPLAVEHGA	117
DHPS_Tp	EWLVKTAQEAVDLPACIDTTNPLAMEAGLKVHKGKAMINSTTAEQAKMEVFFPMAAKYNA	120
DHPS_Dk	EWLVKVAQETVPLPCCIDSTNPEAIEAGLAVHKGKAMINSTSADQWKMDIYFPMVAVKYNA	119
DHPS_Aa	KWLVEVIQDEVDAVVALDSTTNVDAIEAGLEVHEGSAMINSTTAQPEKME SILPLVAEYDA	117
DHPS_Dt	QWLNVTVQEVTDVTLSDTTNNAEAMEAGLVCKNPAINSTSGDRAKLETIMPMVAVKYDA	117
	: . * . . :*: . * :* .. :****.. : : :*: . : : *	
MeTr_Ch	AIIGLTMNEKGVPKANDRSQALAMELVANADAHGIPMTELYIDPLILPVNVAQEHAVEVL	178
MeTr_Pt	GLIGLTMNEQGVPRDAASRVALAMELVVNADMHGLPMADLYIDPLVLPVNVAQEHGPEVI	179
MeTr_Ad	ALIGLTMNEKGVPKANDRLALAMELVQAADAYGLPMEDLYIDPLVLPVNVAQDHGPEVL	179
MeTr_Mt	ALIGLTMNKTGIPKSDTRLAFAMELVAADEFGLPMEDLYIDPLILPANVAQDHAVEVL	177
DHPS_Tp	ALVALAMNEKGVPKSAEDRTALAMELVAMADAYGIPFQDLYIDPLVLPVNVAQEHAPPEAL	180
DHPS_Dk	AIIGLAMNEKGVPKSAADRVALAMEIVVNADAHGIPMEDLYIDPLMLPCNVAQDHGPEVL	179
DHPS_Aa	NVIGLAMDKSGVPKDAETRTAKAMEIIANADARGIPMENLYIDPLILPVNVAQDHAVEVL	177
DHPS_Dt	DVIGLTMTSAGVSRDANERVAIAVDIMTAMAEFDVPERLYIDPLILPVGVAQNQAMEVV	177
	: :*: . * . :*: . * :**** .. :*: . : : *	
MeTr_Ch	ETIRQIKLMANPAPRTVLGLSNVSKCPDR--PLINRTYLVAMTAGLDAAIMDVDDDAL	236
MeTr_Pt	EAIRQIKMLADPPPRTVIGLSNISQRCAR--RLNRTFMVMCMGAGLDSICDLEDGLL	237
MeTr_Ad	ETIRQVKLLASPPPRTVIGLSNISQCPNR--PLINRTFLAMAMACGLDAAIADVEDEEL	237
MeTr_Mt	KTLQQIKMLADPAPKTVLGLSNVSONCNR--PLINRTFLAMAMACGLDAAIADACDEAL	235
DHPS_Tp	EALRQVKLLSNPAPKTTVGLSNISQKAPNR--PLINRTFLAMAMVCGLDASAIMDADDDDL	238
DHPS_Dk	EAIRQIKTLAAPPRTTTLGLSNISQRCRNR--HLINRTFLIMCMAAGLDSIAIDLEDQEL	237
DHPS_Aa	ETIQRVKKLADPAPNTVLGLSNVSONCNR--KLINRTFLVMAMAVGLDSIAEANDDEL	235
DHPS_Dt	EAIKMFRQLNDPPIKSVLGLSNVYNGTPELHLSILSSTYLVMLMTVGLDAAIADPMDQRL	237
	: : : : . * . :*: . : : : : : : : : * * * : : * *	

Abbildung 18. Aminosäuresequenzvergleich der MeTr_{Ch} mit verschiedenen MeTr und Dihydropteroat-Synthasen (DHPS). *C. hydrogeniformans* (Ch), *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (Pt), *Ammonifex degensii* KC4 (Ad), *M. thermoacetica* (Mt), *Desulfotomaculum kuznetsovii* DSM 6115 (Dk), *Acetohalobium arabaticum* DSM 5501 (Aa) und *Desulfonatospira thiodismutans* (Dt). Die Aminosäuresequenzen wurden mittels ClustalW [91] verglichen. Identische Reste sind mit „*“, konservierte Reste mit „:“ und semikonservierte Reste mit „.“ gekennzeichnet. Entsprechende Reste, die bei MeTr_{Ch} am Öffnen und Schließen der Substratbindetasche beteiligt sind, sind gelb hinterlegt. Konservierte Reste des aktiven Zentrums sind grün gekennzeichnet. Asn200 und die entsprechenden Reste aus anderen Organismen sind pink markiert.

THF-Bindung und Asn200. Die produktgebundene Struktur der MeTr (PDB-Nummer 2YCK [69], Auflösung 2,15 Å) zeigt, dass THF analog zu MeTHF an MeTr bindet. Neben den konservierten Aminosäuren Arg208, Asp161, Gly197, Asn97 und Asp76 befindet sich auch das Wassermolekül W1 in beiden Strukturen an identischen Positionen. Allerdings

zeigen sich, wie in Abbildung 19 dargestellt, strukturelle Unterschiede bezüglich der Asn200-Seitenkette und des Wassermoleküls W2.

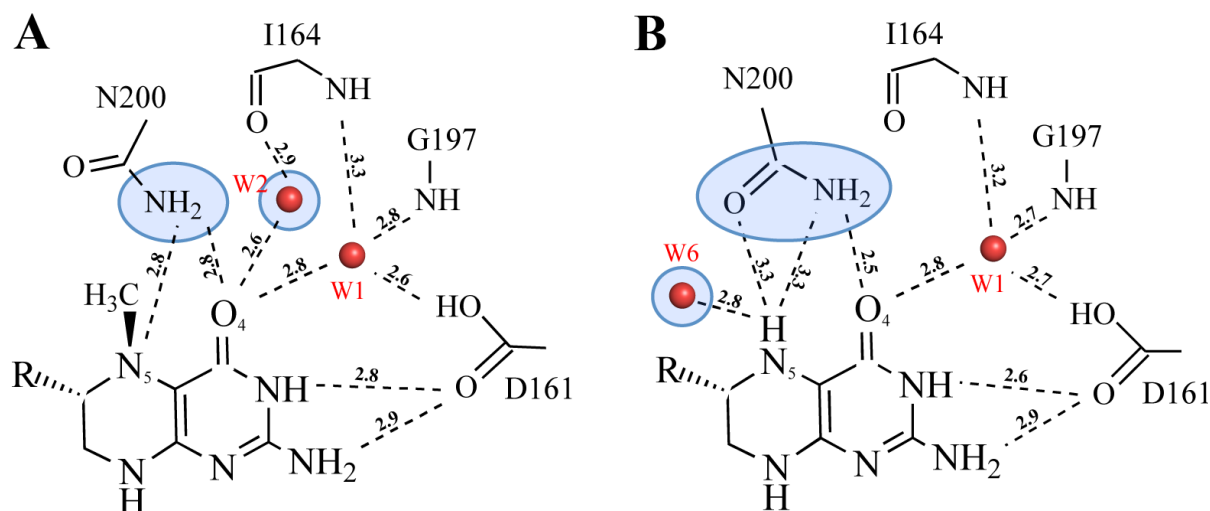


Abbildung 19. Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen MeTr und dem Pterinring von MeTHF (A) und THF (B). Wassermoleküle sind als rote Kugeln und Wasserstoffbrückenbindungen als unterbrochene Linien dargestellt. Abstände sind jeweils in Å angegeben und strukturelle Änderungen farblich (blau) hervorgehoben.

In der substratgebundenen Struktur liegt Asn200 in der „*equal bonding*“-Konformation [69] vor (siehe Abbildung 19A). In dieser befindet sich die Aminogruppe der Asn-Seitenkette mit je 2,8 Å in Wasserstoffbrückendistanz zu N5 und O4 des Pterinrings. In der THF-gebundenen Struktur hingegen zeigt sich der „*dual-bonding*“-Zustand (siehe Abbildung 19B). Hierbei ist der χ^2 -Winkel der Asn200-Seitenkette um 46 ° gedreht und C_γ um 0,5 Å in Richtung des Pterinrings verschoben. Der Carboxamid-Sauerstoff von Asn200 bildet nun eine schwache Wasserstoffbrücke (3,3 Å) zu H-N5 des Pterinrings aus, wohingegen die Carboxamid-NH₂-Gruppe als Wasserstoffbrückendonator für O4 (2,5 Å) und N5 (3,3 Å) dient. In dieser Konformation des Asn200 wird das Wassermolekül W2 verdrängt, welches in der MeTHF-gebundenen Struktur über Wasserstoffbrücken mit O4 des Pterinrings (2,6 Å) und Ile164 (2,9 Å) wechselwirkt. Dafür zeigt sich in der THF-gebundenen Struktur ein neues Wassermolekül (W6) in Wasserstoffbrückendistanz (2,8 Å) zu H-N5 des Pterins.

Um zu testen, ob die homodimere Struktur der MeTr auch in Lösung vorliegt oder durch die Kristallisation bedingt ist, wurden Kleinwinkelstreuexperimente durchgeführt.

3.1.8 Kleinwinkelstreuexperimente

Die aus den experimentellen Streukurven berechneten Abstandsverteilungen weichen für unterschiedliche MeTr-Konzentrationen (1 - 15 mg/ml) kaum voneinander ab (siehe Anhang, Abbildung A3). Dies spricht, wie auch bei MeTr_{Mt} gezeigt [15], für einen einheitlichen Oligomerisierungszustand über den gemessenen Konzentrationsbereich. Die mit SAXS MoW [64] bestimmte Molekülmasse von 56 kDa entspricht einem Homodimer in Lösung (theoretischer Wert: 58 kDa) und stimmt mit den homodimeren Kristallstrukturen der MeTr_{Ch} (PDB-Nummer 2YCI [69]) und MeTr_{Mt} (PDB-Nummer 1F6Y [14]) überein. Das anhand der Streukurven erstellte *ab initio*-Modell (Abbildung 20) passt zur zylindrischen Form des MeTr-Dimers. Dies spiegelt sich auch beim direkten Vergleich der experimentellen Streukurve mit einer anhand der Kristallstruktur (PDB-Nummer 2YCI [69]) simulierten Kurve wider ($\chi^2 = 1,035$).

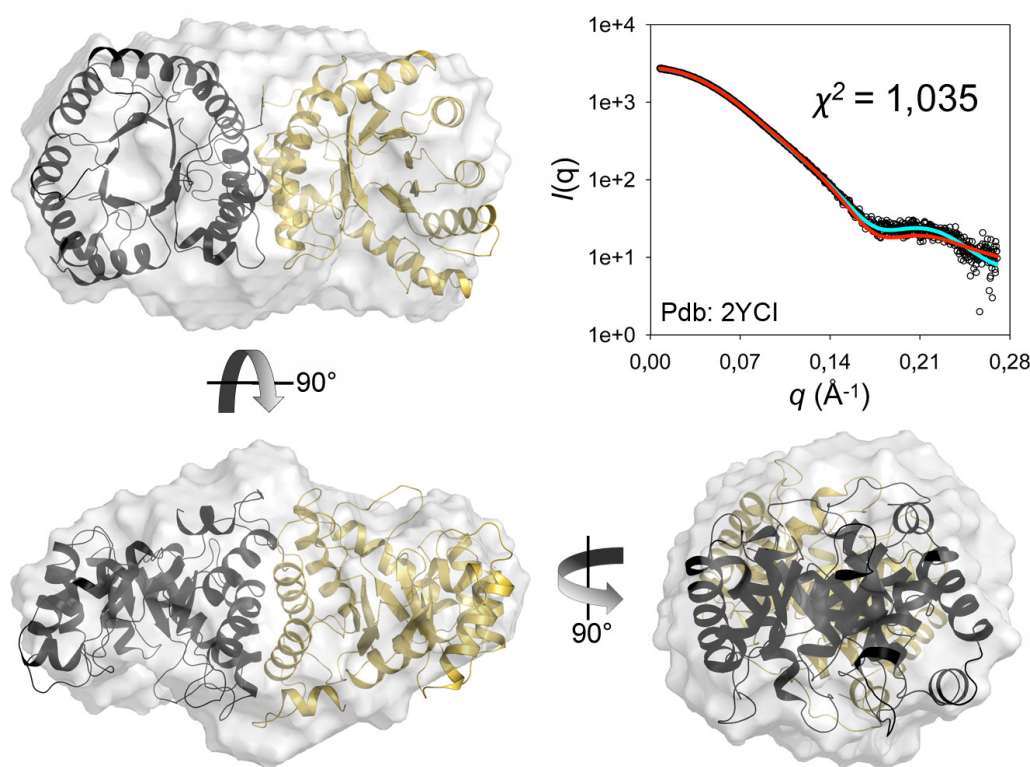


Abbildung 20. *Ab initio*-Modell der MeTr. Die Streukurven der MeTr wurden mit PRIMUS [62] verschmolzen und mittels GNOM [63] prozessiert. Das *ab initio*-Modell, das als graue Oberflächendarstellung abgebildet ist, wurde unter Verwendung der Programme GASBOR [65] und DAMclust [66] erstellt. Die Kristallstruktur des MeTr-Dimers (PDB-Nummer 2YCI [69]) ist als Bändermodell dargestellt, wobei die beiden Monomere schwarz und gold gefärbt sind. Rechts oben sind die Rohdaten des Streuexperimentes (schwarze Kreise), die zugehörige Anpassung (türkise Linie), sowie eine mit Crysol [67] aus der Kristallstruktur berechnete Streukurve (rote Linie) abgebildet.

Für MeTr_{Mt} wurde ebenfalls eine gute Übereinstimmung der dimeren Kristallstruktur (PDB-Nummer 2E7F [16]) mit einem SAXS *ab initio*-Modell beschrieben [15]. Somit ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit beschriebenen MeTr_{Ch}-Kristallstrukturen den physiologischen Zustand des Enzyms in Lösung widerspiegeln, weshalb im folgenden Kapitel ein strukturbasierter Mechanismus beschrieben werden kann.

3.1.9 Asn200-vermittelter Methylgruppentransfer in MeTr

In Übereinstimmung mit den Kristallstrukturen und den Experimenten zur Substratbindung und Aktivierung scheint bei MeTr_{Ch} die Übertragung der Methylgruppe, wie von Doukov *et al.* [16] angenommen, wie folgt zu verlaufen (Abbildung 21):

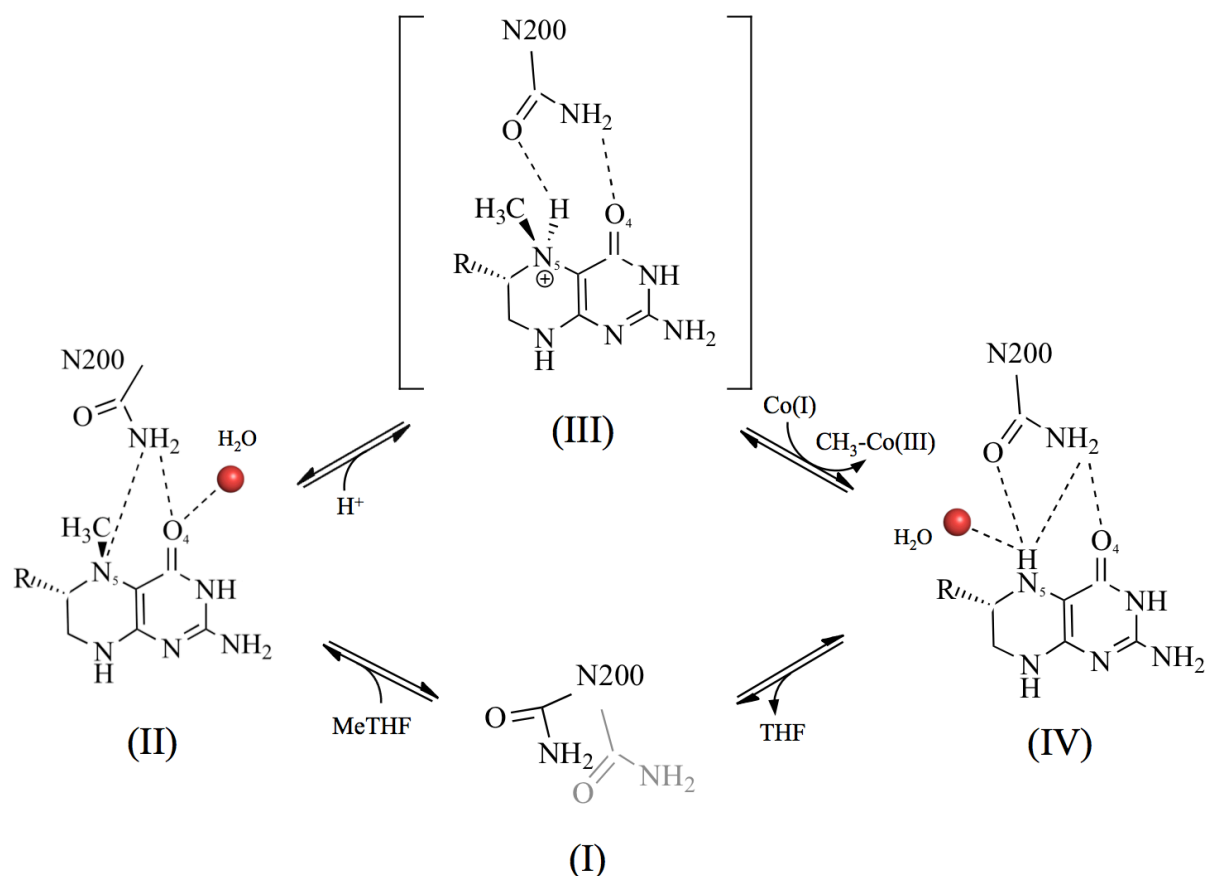


Abbildung 21. Asn200-vermittelter Reaktionsmechanismus der MeTr_{Ch}. Der Mechanismus basiert auf den apo, THF- und MeTHF-gebundenen Strukturen der MeTr und den beobachteten Konformationsänderungen des konservierten Asn200. Die einzelnen Stufen des Mechanismus (I-IV) sind im Fließtext beschrieben.

Im apo-Zustand der MeTr liegt Asn200 in unterschiedlichen Konformationen vor (Stufe I). Sobald das Substrat bindet, wechselt die Asn-Seitenkette in die „*equal-bonding*“-Konformation, in der es Wasserstoffbrücken zu O4 und N5 des Pterinrings ausbildet (Stufe II). MeTHF wird nun durch Protonierung der N5-Position aktiviert und die resultierende positive Ladung kann durch die „*dual-bonding*“-Konformation des Asn200, welche in der produktgebundenen Struktur beobachtet wurde, stabilisiert werden (Stufe III). Das Methylierung wird nun von Co(I)CoFeSP abstrahiert. Das resultierende THF, welches ebenfalls durch die „*dual-bonding*“-Konformation des Asn200 koordiniert wird (Stufe IV), dissoziiert schließlich aus der Substratbindetasche, wodurch MeTr bereit für einen neuen Reaktionszyklus ist.

Der Protondonor zur Aktivierung des MeTHF ist unbekannt, jedoch befinden sich zwei Wassermoleküle (W1 und W2) in Wasserstoffbrückendistanz zum Pterinring. Protonen könnten über Reste, die direkt mit diesen und MeTHF interagieren (z.B. Asp161 oder Asp76), übertragen werden. Auch andere konservierte Aminosäuren in unmittelbarer Umgebung der Substratbindestelle, wie Asp44, könnten an der Substrataktivierung beteiligt sein. Asn200 wurde bereits durch frühere Mutationsstudien an MeTr_{Mt} als Protondonor ausgeschlossen [16]. Um den Einfluss der Aspartatreste Asp44, Asp76 und Asp161 auf die Substratbindung und Aktivierung zu untersuchen, wurden die folgenden Mutationsstudien durchgeführt.

3.1.10 Mutationsstudien

Asp76 und Asp161 wurden zu Asn mutiert. Hierdurch sollten diese Reste nicht mehr in der Lage sein, Protonen an MeTHF abzugeben, wohingegen die Wasserstoffbrückenbildung nicht beeinflusst werden sollte. Asp44, welches nicht direkt mit MeTHF interagiert, wurde zu Ala mutiert. Zunächst wurden die Mutanten mittels ITC, analog zum WT-Enzym (vergleiche Abschnitt (3.1.2), bezüglich ihrer Substratbindung untersucht (Abbildung 22).

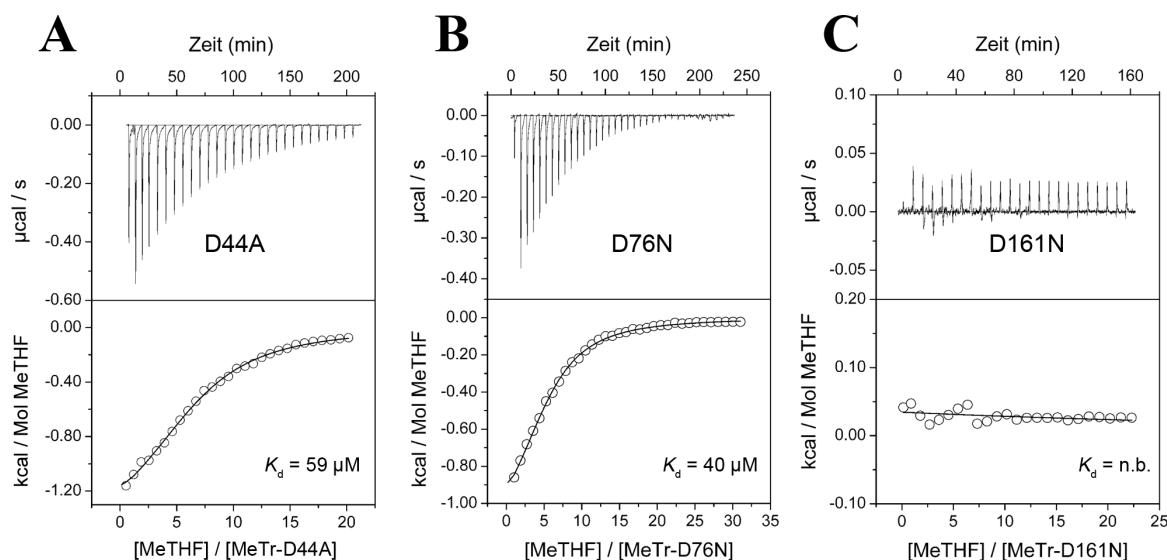


Abbildung 22. ITC Analyse zur Substratbindung verschiedener MeTr-Mutanten. Oben ist jeweils die Wärmeänderung jeder Injektion in Abhängigkeit der Zeit gezeigt. Die Peakflächen wurden integriert, auf die MeTHF-Konzentration normiert und gegen das molare Verhältnis der beiden Interaktionspartner aufgetragen (untere Darstellung). Die durchgezogene Linie repräsentiert die Anpassung der Daten an ein einfaches Bindungsmodell. A) Titration von 2,4 mM MeTHF in 25 μM MeTr-D44A. B) Titration von 2,7 mM MeTHF in 18 μM MeTr-D76N. C) Titration von 2,1 mM MeTHF in 20 μM MeTr-D161N. Die Messungen erfolgten jeweils in 50 mM MOPS/NaOH (pH 7,2) und 150 mM NaCl.

Dabei zeigten alle drei Mutanten eine verringerte Affinität für das Substrat. Die D44A Mutante (Abbildung 22A) weist einen 20-fach höheren K_d -Wert als WT-MeTr auf, obwohl der betroffene Aminosäurerest nicht direkt mit dem Substrat interagiert. Wie in Abbildung 18 gezeigt, ist Asp44 unter Methyltransferasen und Vertretern der Dihydropteroat-Synthasen (DHPS) streng konserviert und trägt zur negativen Oberflächenladung der Bindetasche bei. Außerdem scheint Asp44 durch eine starke Wasserstoffbrücke (Distanz 2,65 Å) das Asp76 zum Substrat hin auszurichten, welches direkt mit dem Pterinring wechselwirkt. Zu einem Alanin mutiert, ist Asp44 nicht mehr in der Lage, als Wasserstoffbrückendonator für Asp76 zu wirken oder zur negativen Oberflächenladung der Bindetasche beizutragen.

Wird Asp76 selbst zu Asn mutiert, ergibt sich eine ebenfalls erhöhte Dissoziationskonstante ($K_d = 40 \mu\text{M}$) für MeTHF (siehe Abbildung 22B), obwohl nach wie vor Wasserstoffbrücken zum Substrat möglich sein sollten.

Bei der D161N-Mutante konnte, wie auch für eine entsprechende Mutante der MetH beschrieben [83, 84], keine Substratbindung nachgewiesen werden (Abbildung 22C).

Asp161, welches wie auch Asp76 unter MeTr und DHPS streng konserviert ist, ist als *pterin hook* bekannt [14] und scheint entscheidend an der MeTHF-Bindung mitzuwirken.

Um auszuschließen, dass die Substratbindung durch eine fehlerhafte Faltung des Enzyms beeinträchtigt wird, wurden die Kristallstrukturen der D44A-, D76N- und D161N-Mutanten mit Auflösungen von 2,3, 2,1 und 2,2 Å bestimmt. Die Statistiken der Datensammlung und Modellverfeinerung sind im Anhang, Tabelle A2 beschrieben.

Mit *r.m.s.*-Abweichungen von 0,22, 0,15 und 0,21 Å sind die Kristallstrukturen praktisch identisch zur Wildtyp-Struktur (Abbildung 23A). Trotzdem scheint die Mutation der sauren Aspartatseitenketten das elektrostatische Umfeld des aktiven Zentrums und somit die MeTHF-Bindung negativ zu beeinflussen.

Neben der Substratbindung wurde auch der Einfluss der Mutationen auf die Kinetik des Methylgruppentransfers auf Co(I)CoFeSP unter MeTHF-Überschuss untersucht. Hierbei wurden Raten für D76N und D44A bestimmt, die jeweils nur ca. 4% des WT-Enzyms betragen. Somit ist die katalytische Effizienz beider Mutanten näherungsweise (k_{cat}/K_d) 1.000-fach gegenüber dem WT-Enzym verringert.

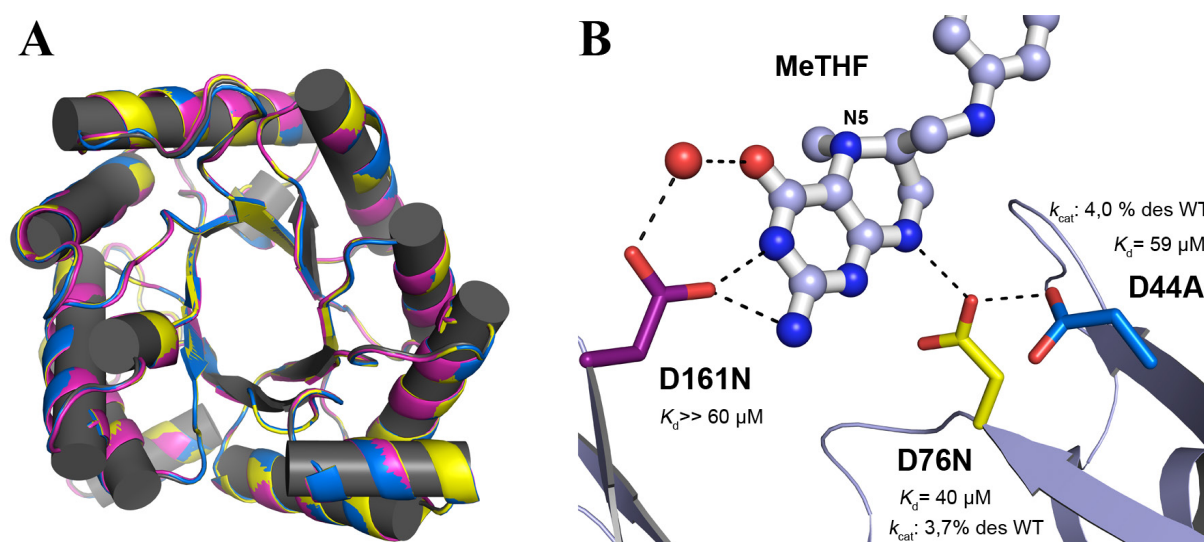


Abbildung 23. Einfluss der MeTr-Mutationen. A) Überlagerung der Kristallstrukturen der D44A- (blaues Bändermodell), D76N- (gelbes Bändermodell) und D161N- (violette Bändermodell) Mutanten der MeTr mit der WT-Struktur (schwarzes Modell mit zylindrischen Helices, PDB-Nummer 2YCI). B) Übersicht über die MeTr-Mutationsstudien. Die mutierten Reste sowie MeTHF sind als Stäbchenmodelle dargestellt. Wasser (W1) ist als rote Kugel abgebildet.

Aufgrund der sehr ähnlichen Einflüsse auf Substratbindung und Methylierungsaktivität (Abbildung 23B) ist es naheliegend, dass Asp44 und Asp76 eine funktionelle Dyade bilden. Asp44 ist vermutlich für die korrekte Positionierung der Asp76-Seitenkette verantwortlich, welche direkt mit dem Pterinring interagiert und so direkten Einfluss auf dessen Polarisierung und Aktivierung nehmen kann. Aufgrund der vorhandenen, wenn auch geringeren, Methylierungsaktivität der D44A- und D76N-Mutanten lassen sich jedoch beide Reste als Protonendonoren zur Substrataktivierung ausschließen.

Da für die D161N-Mutante aufgrund des hohen K_d -Wertes für MeTHF keine Aktivität gemessen werden konnte, kann hier auch keine Aussage über eine mögliche Substrataktivierung getroffen werden. Allerdings zeigen Untersuchungen an Enzymen, die strukturell ein ähnliches aktives Zentrum wie MeTr aufweisen und ihr Substrat vermutlich auch durch Protonierung aktivieren [16], dass ein Protonentransfer von Asp161 über Wasser (W1) auf MeTHF durchaus plausibel ist:

Computergestützte Berechnungen für Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) aus *E. coli* deuten darauf hin, dass das entsprechende Asp (Asp27) der wahrscheinlichste Protonendonor für die N5-Position des MeTHF ist [92]. Zudem zeigen Mutationsstudien, dass die DHFR-Aktivität verschiedener Asp27-Mutanten (D27S und D27N) bei pH 7,0 stark verringert ist. Diese lässt sich jedoch durch niedrigere pH-Werte deutlich erhöhen, wohingegen die Aktivität des WT-Enzyms annähernd konstant bleibt [93]. Strukturelle und biochemische Untersuchungen verschiedener Substratanaloga für die Purin-Nukleosid-Phosphorylase lassen ebenfalls darauf schließen, dass der entsprechende Aminosäurerest (Glu201) entscheidend an der Protonierung des Substrates beteiligt ist [94, 95].

3.2 Das Corrinoideisen/Schwefel-Protein

3.2.1 Heterologe Expression und Reinigung

CoFeSP wurde heterolog in *E. coli* BL21(DE3) bei 37 °C und aeroben Bedingungen produziert. Hierfür wurde ein Koexpressionsvektor verwendet, der die gleichzeitige Expression der beiden CoFeSP-Untereinheiten erlaubt. Wie in Abbildung 24A gezeigt, sind bereits 1 h nach Induktion beide CoFeSP-Untereinheiten deutlich auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu erkennen. Ca. 6 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet, was durchschnittlich zu einer Nasszellausbeute von ca. 7 g pro Liter Zellkultur führte. Für eine typische Reinigung unter anoxischen Bedingungen wurden ca. 15 g Zellen verwendet, was je nach Batch zu 30 - 80 mg CoFeSP führte. Das gereinigte Protein eluierte nach 78 ml von der Gelfiltrationssäule (Anhang, Abbildung A1). Dies entspricht einer theoretischen Molekülmasse von 75 kDa, was gut mit einem Heterodimer aus CfsA (48 kDa) und CfsB (34 kDa) übereinstimmt. Durch SDS-PAGE wurde ebenfalls ein equimolares Verhältnis der beiden Untereinheiten nachgewiesen (Abbildung 24B).

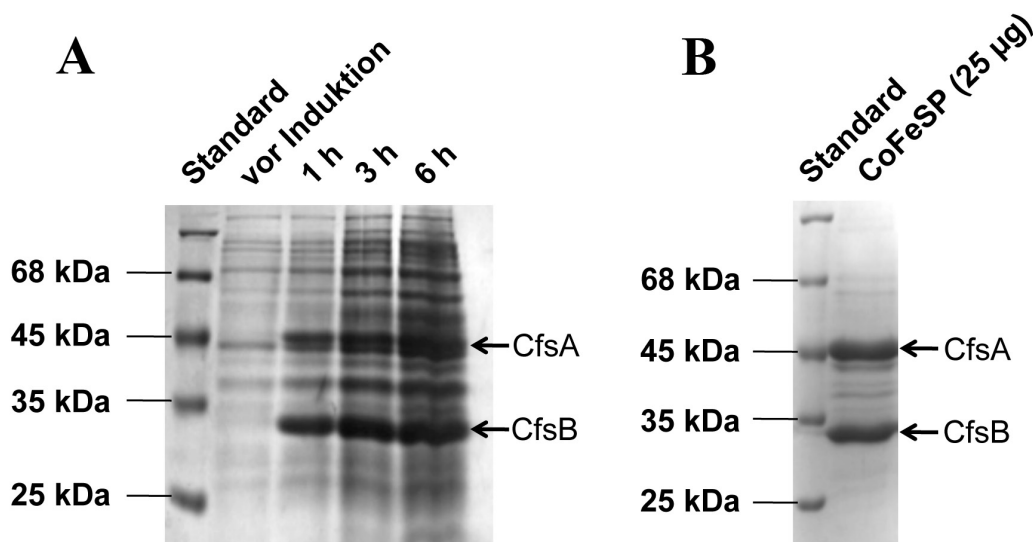


Abbildung 24: Heterologe Produktion des CoFeSP-Heterodimers. A) zeigt ein 12%iges (w/v) SDS-Polyacrylamidgel der *acsCD* Koexpression, wobei Proben die unmittelbar vor bzw. 1 h, 3 h und 6 h nach Induktion genommen worden waren, aufgetragen sind. B) 12%iges (w/v) SDS-Polyacrylamidgel, auf das 25 µg des gereinigten CoFeSP-Heterodimers (bestehend aus CfsA und CfsB) aufgetragen wurden. Als Standard wurden jeweils 10 µl Molekulargewichtsmarker (SM0431, Fermentas) verwendet.

3.2.2 Spektroskopische Charakterisierung

Das isolierte CoFeSP-Heterodimer zeigte ein UV/Vis-Spektrum mit ausgeprägten Schultern bei 320 und 420 nm (Abbildung 25, FeS), was auf einen oxidierten [4Fe4S]-Cluster hindeutet [96]. Anhand einer kolorimetrischen Methode wurde ein Eisengehalt von $3,3 \pm 0,1$ Mol Fe pro Mol CoFeSP bestimmt. Der Corrinoïd-Kofaktor konnte nachträglich durch Inkubation des „apo“-Proteins (auf Corrinoïd bezogen) mit Hydroxocobalamin rekonstituiert werden. Hierfür musste das Protein nicht zuvor, wie für CoFeSP_{Mt} beschrieben [45, 54], entfaltet werden. Durch die Bildung von Dicyanocobalamin [54] wurden $0,8 \pm 0,1$ Mol Corrinoïd-Kofaktor pro Mol an rekonstituiertem CoFeSP nachgewiesen.

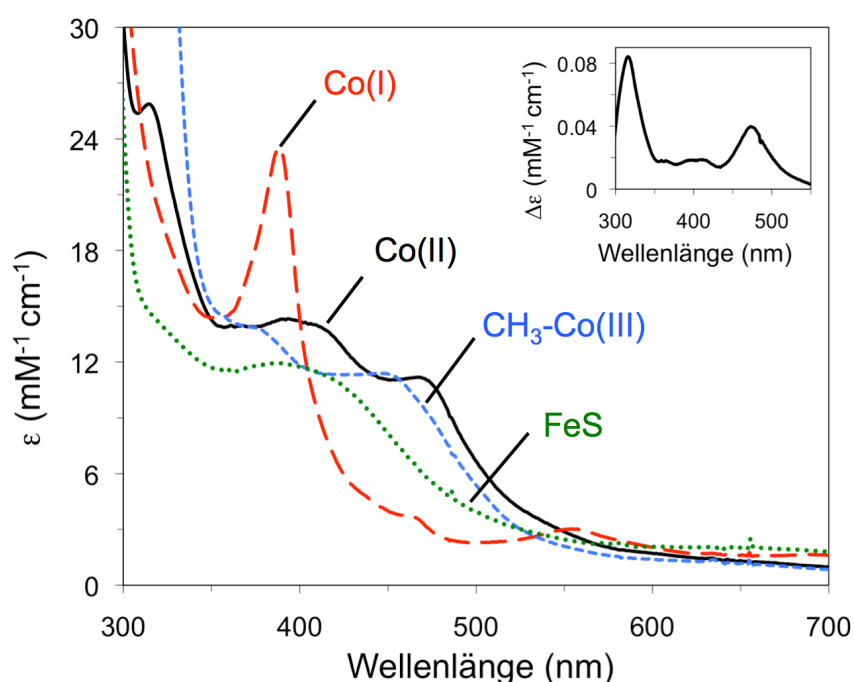


Abbildung 25. UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung von CoFeSP (nach [69]). Die Proteinkonzentration betrug stets 7,5 μ M. Gereinigtes CoFeSP (FeS, grüne Punkte) zeigt lediglich die spektralen Charakteristika eines [4Fe4S]-Proteins. Durch Rekonstitution mit Hydroxocobalamin wurde der Co(II)-Zustand von CoFeSP (Co(II), schwarze Linie) erzeugt, welcher photochemisch zu Co(I) (rote unterbrochene Linie) reduziert werden konnte. Der methylierte CH₃-Co(III)-Zustand (blaue unterbrochene Linie) wurde enzymatisch durch MeTr mit MeTHF als Methylgruppendonor erzeugt. Das *inset* zeigt das Differenzspektrum von rekonstituiertem (Co(II)) und nicht rekonstituiertem (FeS) CoFeSP.

Das rekonstituierte Protein zeigt Absorptionsbanden bei 308, 375, 400 und 470 nm (Abbildung 25, Co(II)), wobei letztere charakteristisch für die „base-off“ Konformation des Co(II)-Cobalamins ist [20, 54, 97]. Das Differenzspektrum von rekonstituiertem und

apo-CoFeSP zeigt den spektralen Beitrag des proteingebundenen Corrinoid-Kofaktors (Abbildung 25, *inset*). Durch Zugabe starker Reduktionsmittel wie DT oder Ti(III)-Citrat, sowie durch photochemische Reduktion, konnte aus dem Co(II)-Zustand der katalytisch aktive Co(I)-Zustand erzeugt werden (Abbildung 25, Co(I)). Hierbei zeigte sich, wie auch für CoFeSP_{Mt} beschrieben [54, 97], ein für den Co(I)-Zustand charakteristisches Absorptionsmaximum bei 390 nm ($\epsilon_{390} = 21,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sowie eine Schulter bei 462 nm und ein lokales Maximum bei 555 nm. Der methylierte CH₃-Co(III)-Zustand konnte entweder enzymatisch durch MeTr (siehe Abschnitt 3.1.4) aus Co(ICoFeSP oder durch Rekonstitution des apo-Proteins mit Methylcobalamin erzeugt werden. Wie auch für *M. thermoacetica* beschrieben [54, 97], zeigt methyliertes CoFeSP (Abbildung 25, CH₃-Co(III)) eine charakteristische Absorptionsbande bei 450 nm.

3.2.3 Kristallisation

Da vor dieser Arbeit nur eine CoFeSP-Struktur verfügbar war, in der aufgrund der inneren Unordnung im Proteinkristall die N-terminale [4Fe4S]-Cluster-Bindedomäne nicht sichtbar war (PDB-Nummer 2H9A [19]), wurde systematisch nach neuen Kristallisationsbedingungen gesucht. CoFeSP kristallisierte in zahlreichen, vorwiegend PEG-haltigen Bedingungen. Jedoch zeigten nur Kristalle, die in einer Präzipitantlösung mit 33% (w/v) PEG 3350, 0,1 M Na-Acetat (pH 6,1), 10% (v/v) Glycerin und 1 mM Na-DT wuchsen (Abbildung 26), eine um 14 Å längere Einheitszelle als die von Sventlitchnaia *et al.* untersuchten Kristalle. Die Raumgruppe (C2) war in beiden Fällen identisch.

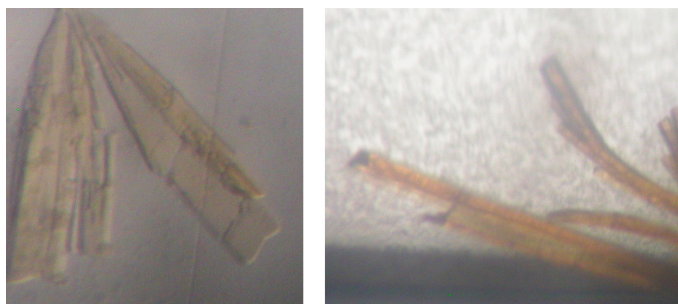


Abbildung 26. CoFeSP-Kristalle. Die Kristallisation erfolgte bei 17 °C im *sitting-drop* Verfahren unter anoxischen Bedingungen in 33% (w/v) PEG 3350, 0,1 M Na-Acetat (pH 6,1), 10% (v/v) Glycerin und 1 mM DT. Für Röntgenbeugungsexperimente wurden Bruchstücke der gezeigten Kristalle verwendet.

3.2.4 Die vollständige CoFeSP-Struktur

Gesamtstruktur. Durch Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell (PDB-Nummer 2H9A [19]) und anschließender Strukturverfeinerung konnte schließlich in Zusammenarbeit mit Dr. Jae-Hun Jeoung (Humboldt-Universität zu Berlin) die vollständige CoFeSP-Struktur mit N-terminaler Domäne mit einer Auflösung von 1,95 Å gelöst werden (Abbildung 27). Die Statistiken der Diffraktionsdaten und Strukturverfeinerung sind im Anhang, Tabelle A3 gezeigt.

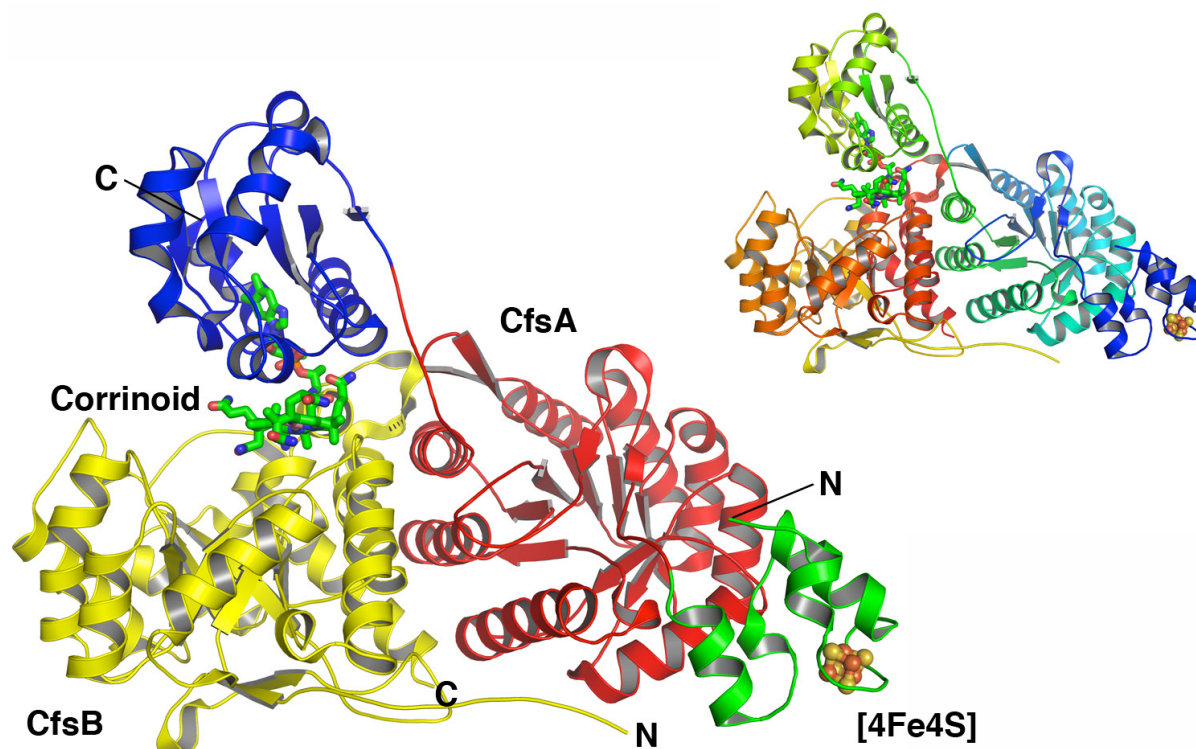


Abbildung 27. Bänderdarstellung des Corrinoideisen/Schwefel-Proteins mit N-terminaler [4Fe4S]-Cluster Bindedomäne (PDB-Nummer 2YCL [69]). In der linken Abbildung ist die CfsB Untereinheit gelb, die N-terminale CfsA-Domäne grün, die mittlere CfsA-Domäne rot und die C-terminale CfsA-Domäne blau gefärbt. Der Corrinoideisen-Kofaktor und der [4Fe4S]-Cluster sind als Stäbchenmodelle dargestellt. In der rechten Abbildung sind die Reste kontinuierlich von blau (N-Terminus an CfsA) über grün und gelb zu rot (C-Terminus an CfsB) gefärbt.

Die Gesamtstruktur des Heterodimers und die Anordnung von CfsB und der C-terminalen, bzw. mittleren CfsA Domäne entsprechen weitestgehend der von Sventlitchnaia *et al.* beschriebenen Struktur des aus *C. hydrogeniformans* nativ isolierten CoFeSP [19]. Auch die Position des Corrinoideisen-Kofaktors ist in beiden Strukturen identisch und scheint nicht durch die nachträgliche *in vitro*-Rekonstitution beeinträchtigt zu werden. Das Corrinoideisen befindet sich in der *base-off*-Konformation und besitzt nur einen schwach gebundenen Wasserliganden

in der β -Position (O-Co Distanz: 3,3 Å). Wie von Svetlichnaia *et al.* beschrieben, befindet sich Thr374 auch hier der α -Position des Co-Ions am nächsten (siehe Abbildung 28A).

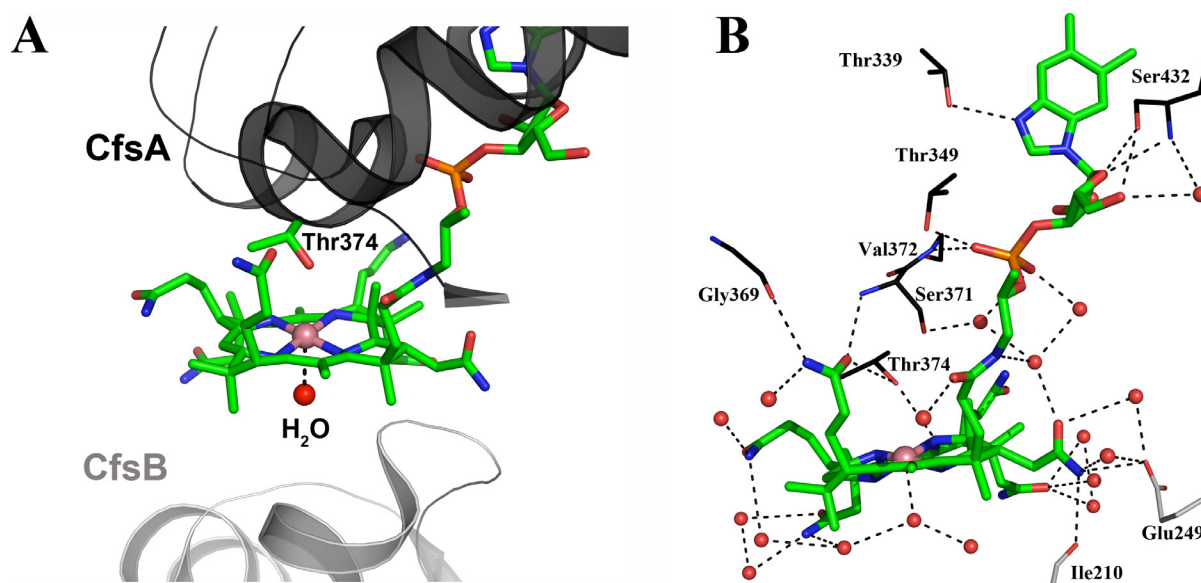


Abbildung 28. Stäbchenmodell des Corrinoid-Kofaktors. A) Einbettung des Kofaktors in die Proteinmatrix. Die beiden Untereinheiten sind als Bändermodell abgebildet, wobei CfsA schwarz und CfsB grau gefärbt sind. B) Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen CoFeSP und dem Corrinoid-Kofaktor. Die relevanten Reste sind als Stäbchen (CfsA in schwarz, CfsB in grau) und Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt.

Insgesamt interagieren sieben Aminosäuren der großen Untereinheit (Gly369, Thr374, Ser371, Val372, Thr349, Thr339 und Ser432), zwei Reste der kleinen Untereinheit (Ile210 und Glu249), sowie 18 Wassermoleküle direkt über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Corrinoid-Kofaktor (Abbildung 28B).

N-terminale CfsA Domäne. Die flexible N-terminale Domäne (CfsA, Aminosäure 1 - 58) weist vier Helices (drei α -Helices: H1-H3; eine 3_{10} -Helix: 3_{10} -H, Abbildung 29A) auf, die in der Reihenfolge α H1- α H2- 3_{10} H- α H3 angeordnet sind. Die bündelartige Geometrie dieser Helices ähnelt dem vier-Helix-Bündel der [2Fe2S]-Cluster-Bindedomäne der Molybdän Hydroxylase/Xanthin-Oxidoreduktase-Familie [98, 99], jedoch konnten zum Zeitpunkt der Strukturaufklärung keine homologen Proteinstrukturen gefunden werden. Erst die N-terminale Domäne der wenig später aufgeklärten CoFeSP_{Mt}-Kristallstruktur (PDB-Nummer 4DJD [100]) zeigte eine praktisch identische Geometrie mit einer *r.m.s.*-Abweichung von 0,9 Å bezüglich der C $_{\alpha}$ -Atome.

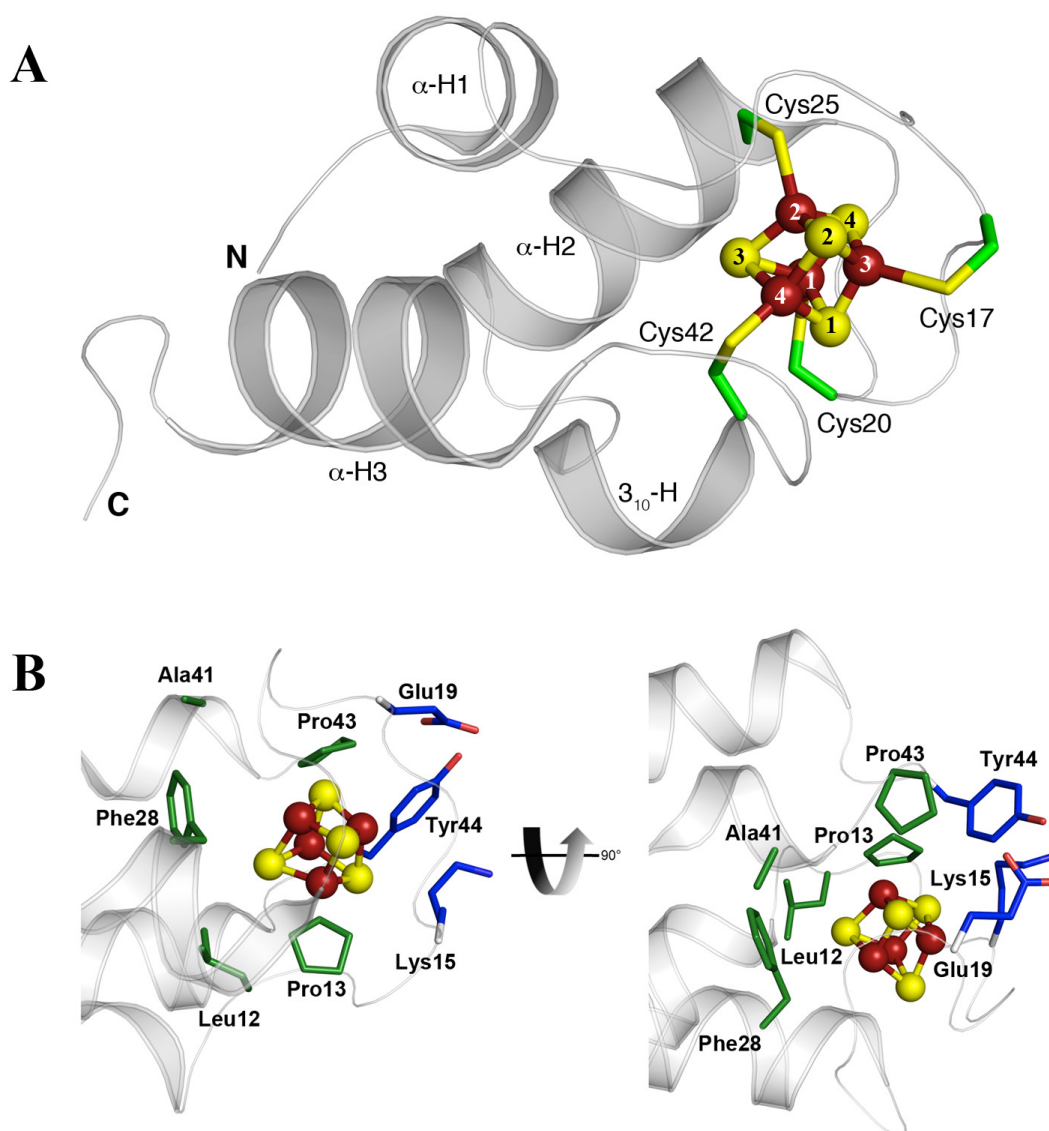


Abbildung 29. Bänderdarstellung der [4Fe4S]-Cluster-Bindedomäne von CoFeSP. Die Anordnung der Helices (α -H1 bis α -H3 und 3_{10} -H) sowie die Koordination des FeS-Clusters (Stäbchenmodell) sind in A) gezeigt. Die Fe-Atome sind als rote Kugeln (Ziffern 1-4) und die S-Atome als gelbe Kugeln (Ziffern 1-4) dargestellt. B) zeigt die Umgebung des FeS-Clusters, wobei hydrophobe Reste grün und solche, die den Cluster vor direktem Solvenskontakt schützen, blau gefärbt sind.

Die Position des [4Fe4S]-Clusters konnte anhand einer F_o-F_c -omit map eindeutig bestimmt werden (Anhang, Abbildung A5). Die Cysteinreste des [4Fe4S]-Cluster-Bindemotivs Cys17-X2-Cys20-X4-Cys25-X16-Cys42 befinden sich in den *loop*-Regionen zwischen den Helices α -H1 und α -H2 (Cys17 und Cys20), zwischen 3_{10} -H und α -H3 (Cys42) und am Anfang der Helix α -H2 (Cys25). Die durchschnittliche Bindungslänge zwischen Fe- und S-Atomen beträgt 2,3 Å. Der Abstand zwischen den S_γ -Atomen der koordinierenden Cysteinreste variiert zwischen 2,3 und 2,7 Å. Die ungewöhnlich hohe Bindungslänge zwischen Cys17 und

Fe₃ (2,7 Å) beruht vermutlich auf einer möglichen Überlagerung unterschiedlicher Konformationen. Der Cluster befindet sich unmittelbar an der Oberfläche der N-terminalen CfsA Domäne, ist aber durch die Reste (Lys15, Glu19 und Tyr44) vor dem Solvens geschützt (Abbildung 29B). An der „Rückseite“ des FeS-Clusters erzeugen die Reste Leu12, Pro13, Phe28, Ala41 und Pro43 eine hydrophobe Umgebung.

Die N-terminale Domäne ist mit der mittleren Domäne von CfsA über eine prolinreiche *linker*-Region (Ser55-Ala-Ser-Ala-Pro-Pro60) verbunden. Diese ähnelt der *linker*-Region zwischen der mittleren und C-terminalen CfsA-Domäne. Die schwachen Wechselwirkungen zwischen der N-terminalen und mittleren Domäne beruhen auf einer kleinen Anzahl geladener Seitenketten, die entweder direkt oder durch Wassermoleküle interagieren (Anhang, Abbildung A6). So stehen durch Wasserstoffbrückenbindungen Lys36 und Ala37 (N-terminale Domäne) über Wassermoleküle mit Ile223, Gly225 und Lys226 der mittleren Domäne in Kontakt. Gln218 befindet sich in Wasserstoffbrückendistanz zu Asp40 der N-terminalen Domäne und interagiert über Wassermoleküle mit Lys50 und Glu54. Letzteres befindet sich wiederum in Wasserstoffbrückendistanz zu Arg257 der mittleren Domäne.

Die Funktion der N-terminalen CoFeSP-Domäne ist bislang unklar. Menon und Ragsdale [21, 54]) schlugen vor, dass der [4Fe4S]-Cluster nicht direkt am Methylgruppentransfer beteiligt ist, aber für die Weiterleitung der Elektronen von CODH oder Ferredoxin zum Corrinoid-Kofaktor verantwortlich sein könnte. Zudem zeigen MeTr und RACo in den kürzlich gelösten Komplexstrukturen mit CoFeSP [70, 100] starke Wechselwirkungen mit der N-terminalen Domäne, was auf eine wichtige Rolle bei der Bildung und Stabilisierung der Proteinkomplexe schließen lässt.

3.2.5 Kleinwinkelstreuexperimente

Um die CoFeSP-Struktur in Lösung zu bestimmen, wurden analog zur MeTr Kleinwinkelstreuexperimente durchgeführt. Die für die unterschiedlichen CoFeSP-Konzentrationen (1 - 15 mg/ml) berechneten Abstandsverteilungen zeigen kaum Unterschiede (Anhang, Abbildung A3), was auf einen einheitlichen Oligomerisierungszustand über den gemessenen Konzentrationsbereich schließen lässt. Die anhand der Streukurven bestimmte Molekülmasse von 85 kDa weist auf ein Heterodimer hin und stimmt darin mit der Kristallstruktur und der analytischen Gelfiltration überein. Das aus den Streukurven berechnete *ab initio*-Modell passt ausgezeichnet zur vollständigen CoFeSP-Kristallstruktur (Abbildung 30).

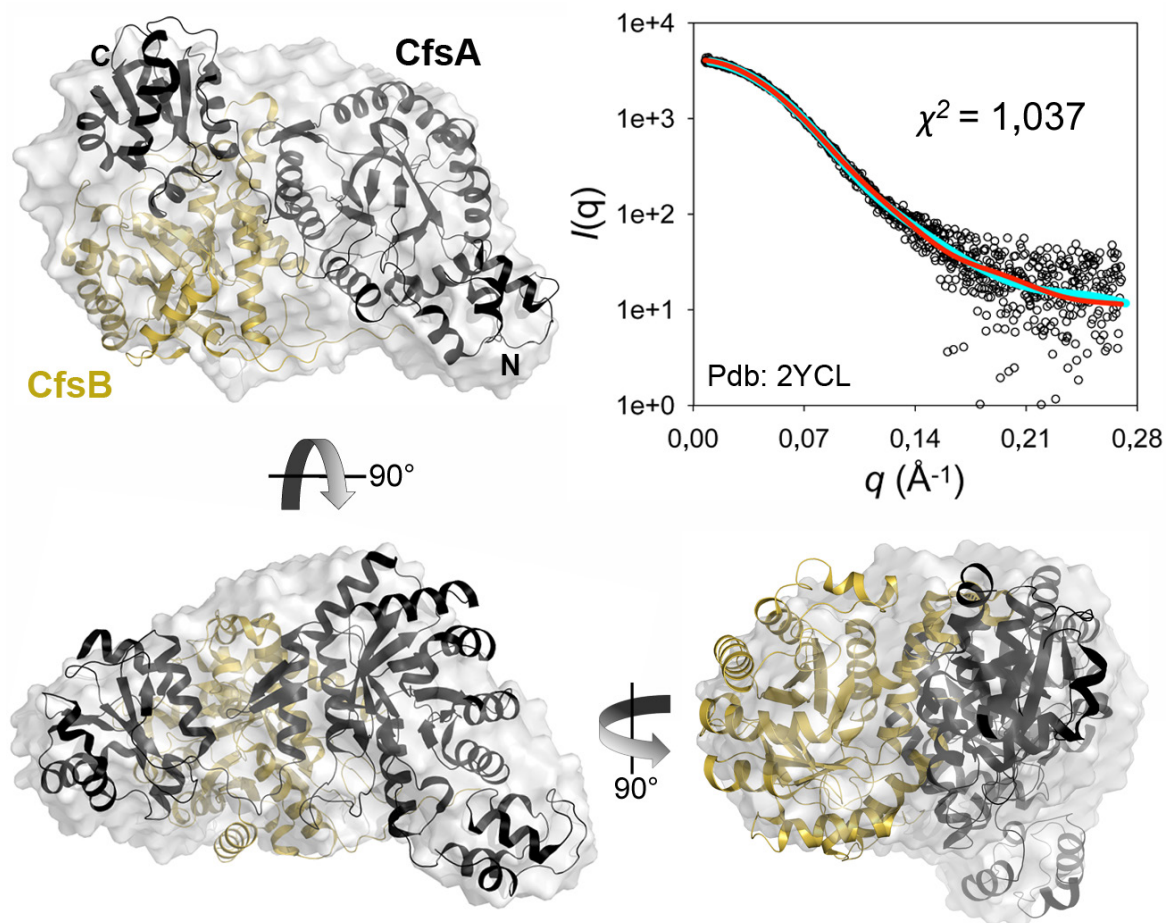


Abbildung 30. *Ab initio*-Modell des CoFeSP. Die Streukurven wurden mit PRIMUS [62] verschmolzen und mittels GNOM [63] prozessiert. Das *ab initio*-Modell, das als graue Oberflächendarstellung abgebildet ist, wurde unter Verwendung der Programme GASBOR [65] und DAMclust [66] erstellt. Die Kristallstruktur des CoFeSP-Heterodimers (PDB-Nummer 2YCL [69]) ist als Bändermodell dargestellt, wobei CfsA schwarz und CfsB golden gefärbt sind. Rechts oben sind die Rohdaten des Streuexperimentes (schwarze Kreise), die zugehörige Anpassung (türkise Linie), sowie eine mit Crysol [67] aus der Kristallstruktur berechnete Streukurve (rote Linie) abgebildet.

Anders als für Kleinwinkelstreuexperimente mit CoFeSP_{Mt} beschrieben [15], lässt das *C. hydrogeniformans* CoFeSP-Modell auch die N-terminale CfsA-Domäne erkennen. Die Übereinstimmung von Modell und Kristallstruktur spiegelt sich auch beim direkten Vergleich der experimentellen und simulierten Streukurve wider ($\chi^2 = 1,037$). Dies spricht dafür, dass CoFeSP auch in Lösung hauptsächlich die Konformation der Kristallstruktur zeigt und keine gleichmäßige Verteilung verschiedener Zustände vorliegt.

3.2.6 Strukturelle Flexibilität des CoFeSP

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, wurde bereits mit der ersten (unvollständigen) Kristallstruktur über verschiedene CoFeSP-Konformationen spekuliert [19]. Da der Corrinoïd-Kofaktor in beiden CoFeSP_{Ch}-Strukturen unzugänglich zwischen CfsA und CfsB verborgen ist, muss es zu weitreichenden konformationellen Änderungen der B12-Bindedomäne kommen, die den Interaktionspartnern von CoFeSP den direkten Kontakt zum Corrinoïd ermöglichen. Um derartige, strukturelle Änderungen in Lösung nachzuweisen, bietet sich die ortsspezifische Markierung des Proteins mit Fluoreszenzfarbstoffen an [101]. Durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) wird Energie strahlungsfrei von einem Donor-Fluoreszenzmarker auf einen Akzeptor übertragen, wobei die FRET-Intensität vom Abstand der beiden Sonden abhängt [102].

3.2.6.1 Doppelte, ortsspezifische Markierung von CoFeSP

Um konformationelle Änderungen zu detektieren, wurden zwei unterschiedliche Cysteinereaktive Fluoreszenzfarbstoffe ortsspezifisch an CoFeSP gekoppelt. Hierzu wurde zunächst ein oberflächennahes Cystein (Cys348) zu Serin mutiert, um eine ungewollte Markierung dieser Position zu verhindern.

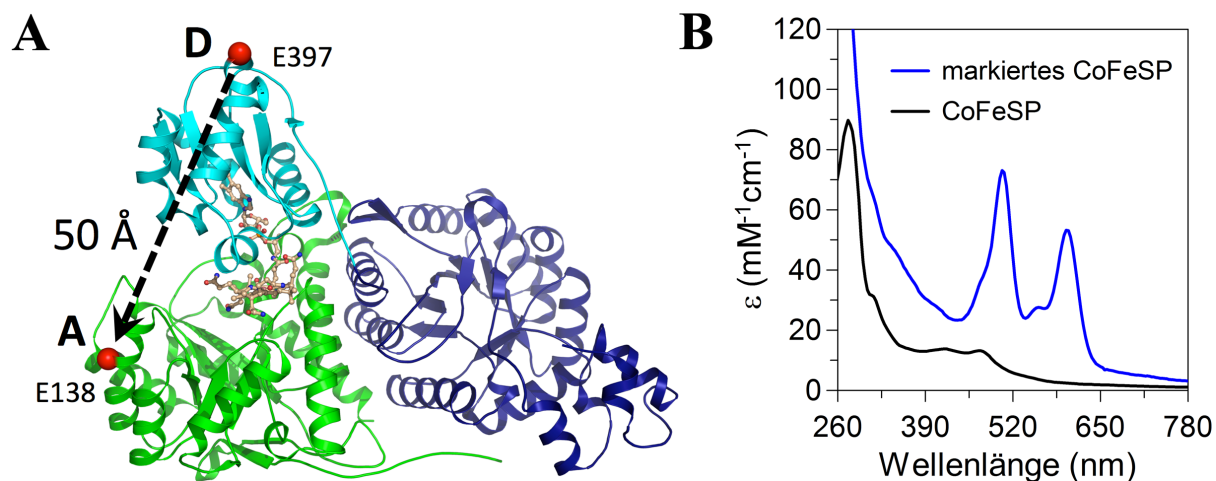


Abbildung 31. Ortsspezifische Markierung von CoFeSP. A) Die markierten Positionen für Donor („D“: E397, CfsA) und Akzeptor („A“: E138, CfsB) sind als rote Kugeln dargestellt. Die CoFeSP Untereinheiten sind als Bändermodell abgebildet, wobei CfsB grün und CfsA blau gefärbt sind. Die B12-bindende CfsA-Domäne ist hellblau dargestellt. Die UV/Vis-Spektren von CoFeSP (schwarze Linie) und ortsspezifisch mit Atto 488 und Atto 590 markiertem CoFeSP (blaue Linie) sind in B) gezeigt.

Anschließend wurden geeignete Glutamatreste am „Kopf“ der vermutlich flexiblen B12-bindenden CfsA-Domäne (E397), sowie an der CfsB-Untereinheit (E138) zu Cysteinen mutiert (Abbildung 31A). Um CoFeSP selektiv und ortsspezifisch zu markieren, wurden beide Untereinheiten getrennt voneinander exprimiert und gereinigt. Nach Markierung der kleinen, löslichen Untereinheit wurde die intakte CoFeSP-Trippelmutante, wie unter Abschnitt 2.22.1 beschrieben, durch die Zugabe der unlöslichen CfsA-Doppelmutante, Harnstoff und Hydroxocobalamin hergestellt. Anschließend erfolgte die Kopplung des zweiten Farbstoffs. Da für FRET-Experimente Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, deren Förster Radius (R_0) in der Größenordnung der erwarteten Abstände (hier: ~ 50 Å, siehe Abbildung 31A) liegt [102], wurden Atto 488 und Atto 590 mit einem R_0 von 60 Å als Donor/Akzeptor-Paar verwendet. Das UV/Vis-Spektrum des doppelt markierten CoFeSP zeigt Maxima bei 505 und 601 nm (Abbildung 31B), die der Donor- bzw. Akzeptorabsorption zugeordnet werden können. Die Markierungseffizienzen wurden anhand der von Atto-Tec bereitgestellten Extinktionskoeffizienten abgeschätzt, was für den Akzeptor auf eine $>65\%$ ige und für den Donor auf eine vollständige Besetzung schließen ließ.

3.2.6.2 Förster-Resonanzenergietransfer

Die strukturelle Flexibilität von CoFeSP wurde anhand der Wechselwirkung mit dem reduktiven Aktivator RACo untersucht. Vorteile dieses Systems bestanden zum einen in der einfachen Handhabung und Gewinnung des oxidierten Co(II)CoFeSP und zum anderen in der stabilen Komplexbildung beider Proteine ($K_d \sim 20$ nM) [70]. Sowohl Komplexbildung als auch Elektronentransfer zwischen reduziertem RACo und der CoFeSP-Trippelmutante waren mit dem Wildtyp vergleichbar (siehe Anhang, Abbildung A7).

Nach Anregung des Donorfarbstoffs (Atto 488) bei 450 nm zeigte sich für doppelt markiertes CoFeSP, neben der Donor-Emission bei 525 nm, ein weiteres Fluoreszenzmaximum bei 620 nm (siehe Abbildung 32A, rote Linie), was der Emissionswellenlänge des Akzeptors (Atto 590) entspricht. Dieser Peak konnte für die freien Farbstoffe in Lösung nicht beobachtet werden. Auch Kontrollexperimente mit einfach markiertem CoFeSP (nur Donor oder Akzeptor) zeigten bei gleicher Farbstoffkonzentration kein vergleichbares Fluoreszenzmaximum bei 620 nm. Dies lässt darauf schließen, dass es durch die Anregung bei 450 nm tatsächlich zu einem Förster-Resonanzenergietransfer von Donor zu Akzeptor kam.

CoFeSP:RACo-Komplexassoziation. Nach Zugabe von RACo zeigte sich ein Anstieg der Akzeptor-Fluoreszenz, wohingegen die Fluoreszenz des Donors bei 525 nm abnahm (Abbildung 32A, schwarze Linie). Dies spricht für einen Anstieg der FRET-Effizienz, was auf eine Annäherung der markierten Positionen schließen lässt. Weder das ausschließlich mit Donor, noch das nur mit Akzeptor markierte CoFeSP zeigten eine entsprechende Zunahme des Fluoreszenzsignals bei 620 nm nach RACo-Zugabe (siehe Anhang, Abbildung A8).

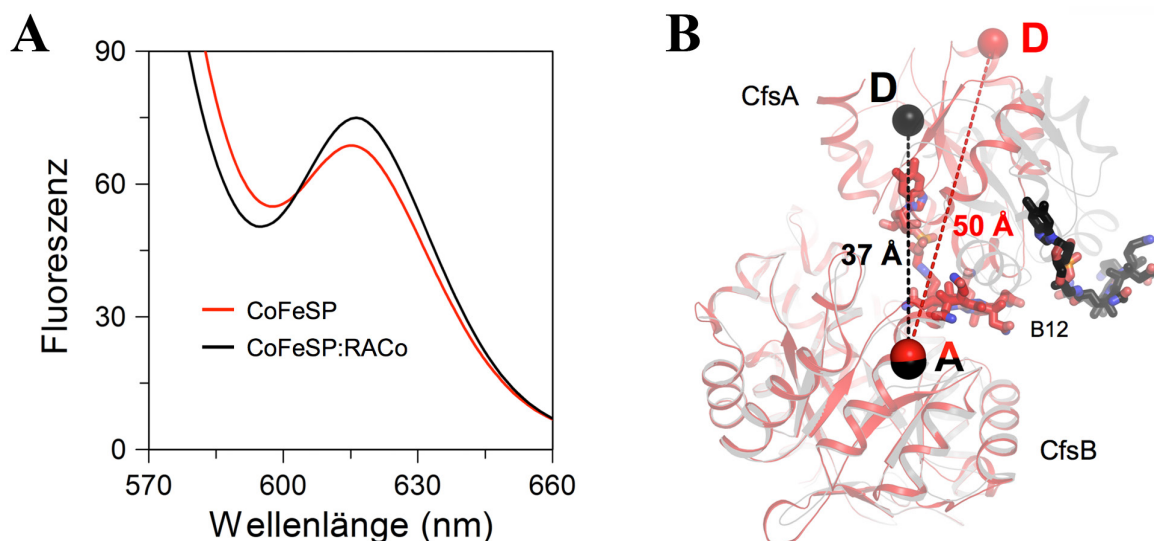


Abbildung 32. FRET im CoFeSP:RACo-Komplex. A) zeigt das FRET-Signal für doppelt markiertes CoFeSP vor (rote Linie) und nach der RACo-Zugabe (schwarze Linie). Die Konzentration an doppelt markiertem CoFeSP betrug hierbei 1 μM , welches für die Komplexbildung mit einem 10-fach molaren Überschuss an RACo versetzt wurde. Die Anregungswellenlänge betrug stets 450 nm. In B) ist eine Überlagerung der freien CoFeSP-Struktur (rotes Bändermodell) mit CoFeSP aus der CoFeSP:RACo-Komplexstruktur ([70], graues Bändermodell) gezeigt. Die jeweiligen FRET-Donor- und Akzeptor-Positionen sind als schwarze bzw. rote Kugeln dargestellt und mit „D“ und „A“ gekennzeichnet.

Zeitgleich zur Präparation der ersten FRET-Proben wurde die Kristallstruktur des CoFeSP:RACo-Komplexes von Hennig *et al.* gelöst [70]. Im Komplex zeigte CoFeSP, wie angenommen, massive konformationelle Änderungen. Durch eine Drehung der B12-Bindedomäne um ca. 45° ist in der Komplexstruktur der C_α -Abstand der beiden markierten Positionen um 13 Å kürzer (siehe Abbildung 32B), was qualitativ in Einklang mit der beobachteten Zunahme der FRET-Effizienz nach RACo-Zugabe steht.

Anhand der beobachteten Fluoreszenzzunahme konnte nun auch die Kinetik der Komplexbildung zwischen CoFeSP und RACo, wie unter Punkt 2.22.2 beschrieben, untersucht werden. Hierzu wurden verschiedene RACo-Konzentrationen (2,5 - 30 μM) mit

markiertem CoFeSP ($0,25 \mu\text{M}$, bzw. $0,75 \mu\text{M}$) gemischt. Da RACo stets mindestens 10-fach im Überschuss vorlag, waren in guter Näherung Bedingungen pseudo-erster Ordnung gegeben. Wie auch in den Vorversuchen zeigte sich nach RACo-Zugabe ein rascher Anstieg der Akzeptor-Emission. In Abbildung 33A sind die Progresskurven für vier unterschiedliche RACo-Konzentrationen ($6, 12, 18, 24 \mu\text{M}$) dargestellt.

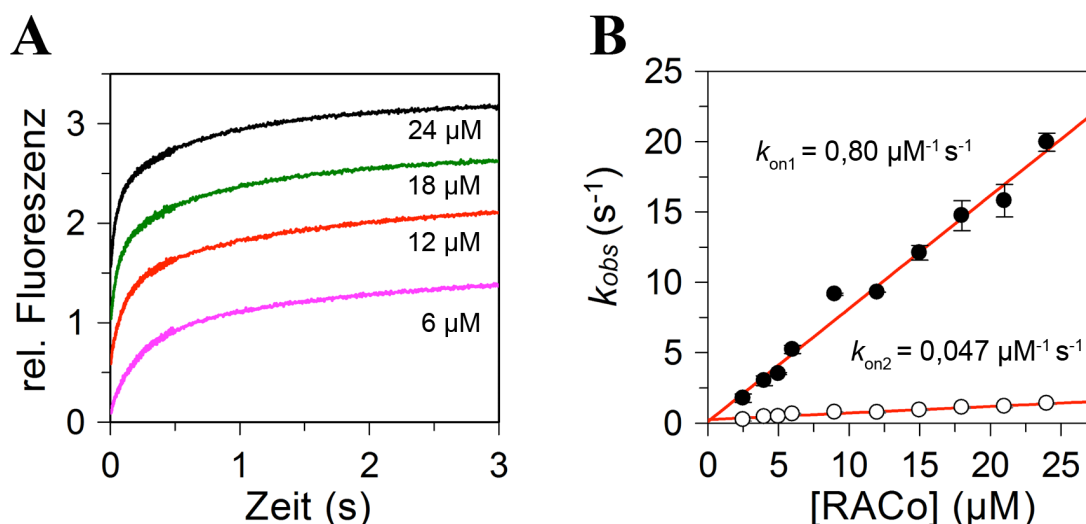


Abbildung 33. Transiente Kinetik der CoFeSP:RACo Komplexbildung. A) zeigt beispielhaft die gemittelten Transienten für die Reaktion von $6, 12, 18$ und $24 \mu\text{M}$ RACo mit markiertem CoFeSP ($0,25$ bzw. $0,75 \mu\text{M}$). Die Abhängigkeit der beiden beobachteten Raten von der RACo-Konzentration sind in B) dargestellt. Eine lineare Anpassung der Daten (rote Linie) ergab Assoziationsraten von $0,80 \pm 0,04 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für die schnelle Phase (schwarze Kreise) und $0,047 \pm 0,003 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für die langsamere Phase (weisse Kreise), sowie Dissoziationsraten von $0,1 \pm 0,5 \text{s}^{-1}$ (schnelle Phase) und $0,25 \pm 0,04 \text{s}^{-1}$ (langsamere Phase). Die Fehlerangabe (\pm) bezieht sich hier auf den Fehler der Anpassung.

Die Transienten konnten am besten durch die Summe zweier Exponentialfunktionen (Gleichung 7, $i = 2$) angepasst werden. Bei hohen RACo-Konzentrationen machte sich aufgrund des besseren Signal zu Rauschverhältnisses die Biphasigkeit der Messkurven stärker bemerkbar. Die beiden resultierenden Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) jeder Kurve liegen etwa eine Größenordnung auseinander und hängen beide linear von der zugegebenen RACo-Konzentration ab (siehe Abbildung 33B). Dabei tragen beide Phasen zu gleichen Teilen zur Gesamtamplitude bei. Während die Assoziationsraten mit $0,80 \pm 0,04 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und $0,047 \pm 0,003 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für die beiden Phasen durch die Steigung der Gerade gut definiert sind, bleiben die Dissoziationsraten durch den Abszissenschnittpunkt hierbei relativ ungenau bestimmt.

CoFeSP:RACo-Komplexdissoziation. Zur genaueren Bestimmung der Dissoziationsrate wurde ein Verdrängungsexperiment durchgeführt. Hierfür wurde der markierte CoFeSP:RACo-Komplex vorgelegt und mit einem 50-fach molaren Überschuss an unmarkiertem CoFeSP gemischt. Dieses verdrängt das markierte CoFeSP aus dem Komplex, trägt aber selbst nicht zum Fluoreszenzsignal bei. Die Zugabe des unmarkierten CoFeSP führte zu einer Abnahme der Akzeptorfluoreszenz (siehe Abbildung 34), was auf die erwartete Komplexdissoziation und die Umlagerung des markierten CoFeSP zurückzuführen ist.

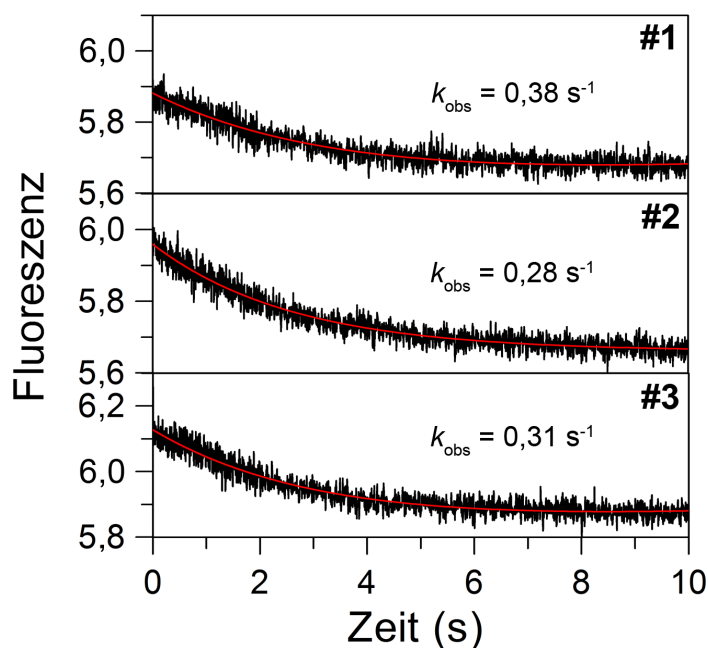


Abbildung 34. Verdrängungsexperiment zur CoFeSP:RACo-Komplexdissoziation. Eine konstante Konzentration an doppelt markiertem CoFeSP:RACo-Komplex ($2 \mu\text{M}$) wurde in Dreifachbestimmung (#1-3) mit einem 50-fach molaren Überschuss an unmarkiertem CoFeSP gemischt und die Akzeptor-Fluoreszenz nach Anregung bei 450 nm verfolgt. Eine Anpassung der Transienten (rote Linie) mit Gleichung 7 ergab eine Dissoziationsrate von $0,32 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$. Die Fehlerangabe (\pm) entspricht hier der Standardabweichung der erhaltenen k_{obs} -Werte.

Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und aus den Progresskurven eine Dissoziationsrate von $0,33 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Somit scheinen weder die Ausbildung des *encounter*-Komplexes, noch die Umlagerung der B12-Bindedomäne von CoFeSP geschwindigkeitsbestimmende Schritte der ATP-abhängigen Aktivierung (Elektronentransfer-Rate $\sim 0,04 \text{ s}^{-1}$; siehe Anhang, Abbildung A7) zu sein. Es ist jedoch durchaus möglich, dass es im CoFeSP:RACo-Komplex durch die ATP-Bindung zu weiteren strukturellen Änderungen

kommt [70], welche die Rate des Elektronentransfers limitieren könnten. Bislang ist jedoch nur eine CoFeSP:RACo-Komplexstruktur ohne gebundenes Nukleotid verfügbar, bei der zudem die Position des [2Fe2S]-Clusters von RACo nicht bestimmt werden konnte [70]. Für ein umfassenderes Verständnis der konformationellen Änderungen bei der reduktiven Aktivierung von CoFeSP könnte beispielsweise auch RACo mit ortsspezifischen Sonden markiert und mittels (Einzelmolekül-) FRET untersucht werden.

Unter Berücksichtigung der Assoziations- und Dissoziationsexperimente wird im folgenden Abschnitt ein Minimalmodell der Wechselwirkung zwischen CoFeSP und RACo diskutiert.

CoFeSP:RACo-Interaktion. Die beiden im Assoziationsexperiment beobachteten Relaxationen deuten zunächst darauf hin, dass für eine mechanistische Beschreibung der Wechselwirkung zwischen CoFeSP und RACo mindestens zwei Elementarschritte (Anlagerung und FRET-sensitive CoFeSP-Umlagerung) nötig sind. Eine Simulation der kinetischen Daten (siehe Anhang, Abbildung A9), die in Zusammenarbeit mit Dr. Tobias Werther (Humboldt-Universität zu Berlin) durchgeführt wurde, zeigt jedoch, dass sich die beobachtete Biphasigkeit der Transienten nicht durch sequenzielle Reaktionsschritte erklären lässt. Zum einen weisen die experimentellen Progresskurven keine sichtbaren *lag*-Phasen auf und zum anderen hängen beide k_{obs} -Werte linear von der RACo-Konzentration ab. Daher ist davon auszugehen, dass der Umlagerungsschritt deutlich schneller als die geschwindigkeitsbestimmende Komplexbildung verläuft und aufgrund der geringen Amplituden und schnellen Raten experimentell nicht fassbar ist.

Der biphasische Charakter der Transienten kann durch die Annahme einer CoFeSP-Heterogenität erklärt werden (siehe Anhang, Abbildung A9). Hierdurch lassen sich sowohl die lineare Abhängigkeit beider k_{obs} -Werte, als auch die ähnlich großen Amplituden mit gleichen Vorzeichen simulieren. Die Annahme einer zweiten CoFeSP-Population deckt sich auch mit Gelfiltrationsläufen, die trotz der hohen Affinität von RACo zu CoFeSP [70] ca. 50% an freier CoFeSP-Mutante zeigen (Anhang, Abbildung A7). Mögliche Ursachen hierfür sind z.B. eine mangelnde Kofaktorbesetzung des markierten CoFeSP sowie eine unvollständige Rückfaltung des Proteins nach der Harnstoffbehandlung. Eine globale Anpassung der experimentellen Kurven mit Hilfe des Programms KinTek-Explorer war nicht möglich.

Grundsätzlich könnten CoFeSP und RACo anhand der experimentellen Daten sowohl nach dem *induced fit*-Mechanismus [103], als auch nach dem *conformational selection*-Prinzip [104] interagieren (siehe Abbildung 35):

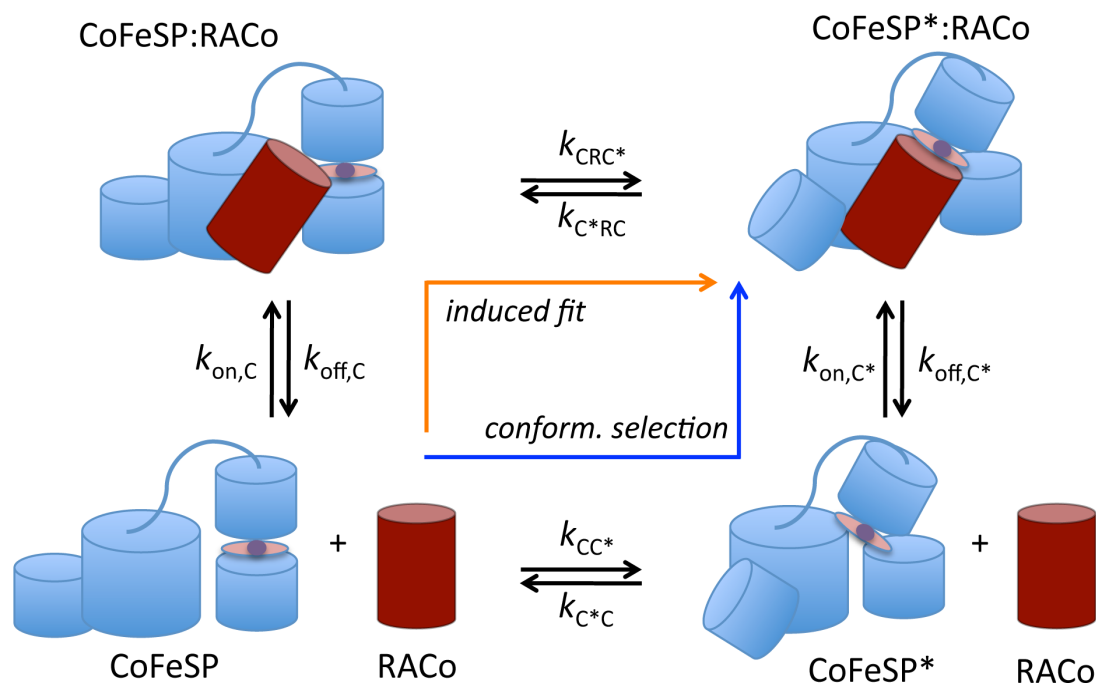


Abbildung 35. *Induced fit* und *conformational selection* bei der CoFeSP:RACo-Komplexbildung. CoFeSP (blau) und RACo (braun) sind dabei schematisch als Zylindermodelle dargestellt. CoFeSP* kennzeichnet die CoFeSP-Konformation, die zur Zunahme der FRET-Intensität führt. *induced fit*: RACo und CoFeSP bilden einen Komplex, worauf es zu konformationellen Änderungen in CoFeSP kommt. *conformational selection*: CoFeSP liegt in mehreren Ausgangszuständen vor, welche sich in einem dynamischen Gleichgewicht befinden. Nur die bereits umgelagerte Konformation ist in der Lage, einen Komplex mit RACo auszubilden.

Beide Fälle würden unter der Annahme einer langsamen Anlagerung und einer schnellen Konformationsänderung im Assoziationsexperiment zu einer linearen Abhängigkeit der k_{obs} -Werte von der RACo-Konzentration führen (Anhang, Abbildung A9). Um zwischen den beiden Modellen zu differenzieren, müssten weitere Experimente, wie beispielsweise ein Assoziationsexperiment unter pseudo-erster Ordnung bezüglich der CoFeSP-Konzentration [105], durchgeführt werden.

3.2.6.3 Gepulste Elektronendoppelresonanz-Messung

Um die beobachtete Annäherung im FRET-Experiment zu quantifizieren und zugleich die Kristallstruktur des CoFeSP:RACo-Komplexes zu überprüfen, wurde die CoFeSP-Mutante mit Nitroxid-Spinmarkern markiert. Durch gepulste Elektronendoppelresonanz (PELDOR) kann anhand der Dipol-Dipol-Wechselwirkung der paramagnetischen Zentren der Abstand der Sonden ermittelt werden [106]. Hierzu wurden analog zum FRET-Experiment die freien Cysteinreste der CoFeSP-Mutante mit 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl)-methanthiosulfonsäure (MTS) gekoppelt. Die Vermessung der Proben und die Auswertung und Simulation der Daten wurde von Dr. Christian Teutloff (Freie Universität Berlin) durchgeführt. Erste Messungen konnten aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses, verursacht durch zu kurze Relaxationszeiten der paramagnetischen Zentren, nicht verwendet werden. Erst durch den Austausch des jeweiligen Probenpuffers gegen deuterierten Puffer und die Zugabe von 50% (v/v) deuteriertem Glycerin gelang es, den Signalhintergrund zu minimieren und auswertbare Daten zu erhalten (siehe Abbildung 36).

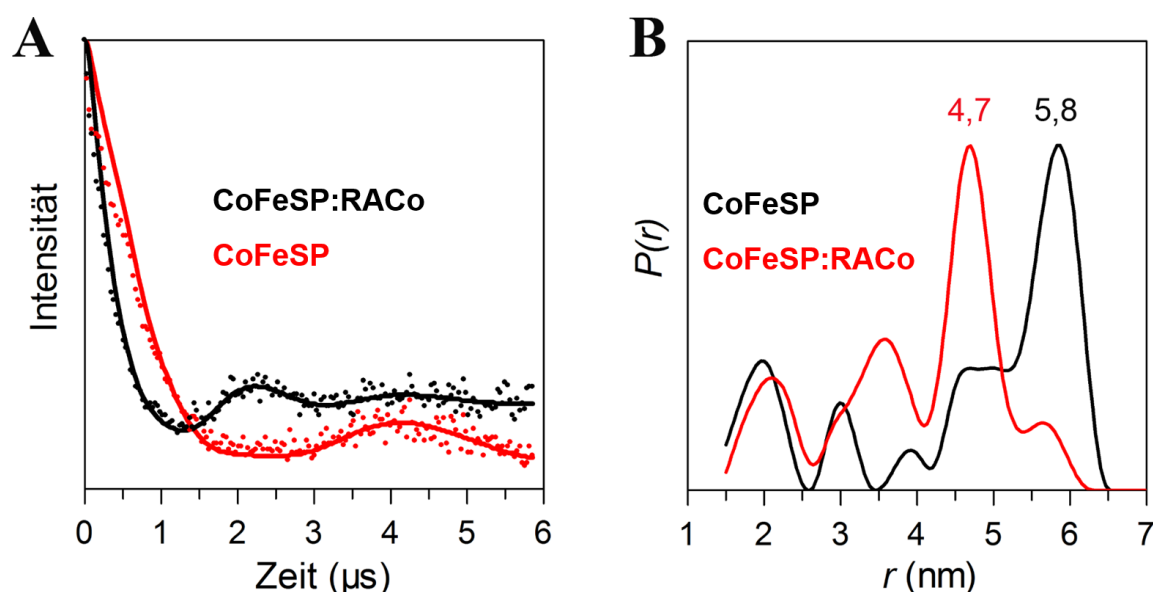


Abbildung 36. Daten und Abstandsverteilung der PELDOR-Messung. A) zeigt die phasen- und hintergrundkorrigierten Rohdaten (Punkte) für CoFeSP (rot) und den CoFeSP:RACo-Komplex (schwarz). Die zugehörigen simulierten Zeitspuren sind als Linien dargestellt. In B) sind die jeweiligen Abstandsverteilungen der Spinmarker dargestellt, die sich aus den simulierten Zeitspuren ergeben.

Bereits bei den um Phase und Hintergrund korrigierten Rohdaten (Abbildung 36A) lassen sich deutliche Unterschiede zwischen freiem und im Komplex mit RACo vorliegendem CoFeSP erkennen. Die zugehörige Abstandsverteilung der Spinlabel (Abbildung 36B) weist

dabei deutliche Maxima bei 4,7 nm für den CoFeSP:RACo-Komplex und 5,8 nm für freies CoFeSP auf. Damit zeigt PELDOR, wie auch im FRET-Experiment beschrieben, eine Annäherung der markierten Positionen im Proteinkomplex. Die ermittelte Abstandsänderung von 1,1 nm stimmt dabei sehr gut mit dem aus den Kristallstrukturen ermittelten Abstand von 1,3 nm überein. Auch eine Simulation der wahrscheinlichsten MTS-Spinmarker Rotamere zeigt eine gute Übereinstimmung der experimentellen und berechneten Abstandsverteilung (siehe Anhang, Abbildung A10). Somit ist davon auszugehen, dass die konformationellen Änderungen von CoFeSP für die reduktive Aktivierung durch RACo von Bedeutung und kein Artefakt der Kristallisation sind.

Ähnliche strukturelle Änderungen wurden auch für den CoFeSP:MeTr_{MT}-Komplex [100] beschrieben. Obwohl die von Kung *et al.* gelöste Komplexstruktur nur eine konformationelle Zwischenstufe des Methylgruppentransfers darstellt, wird auch hier die hohe Flexibilität der B12- und [4Fe4S]-Cluster bindenden Domänen deutlich (siehe Abbildung 37).

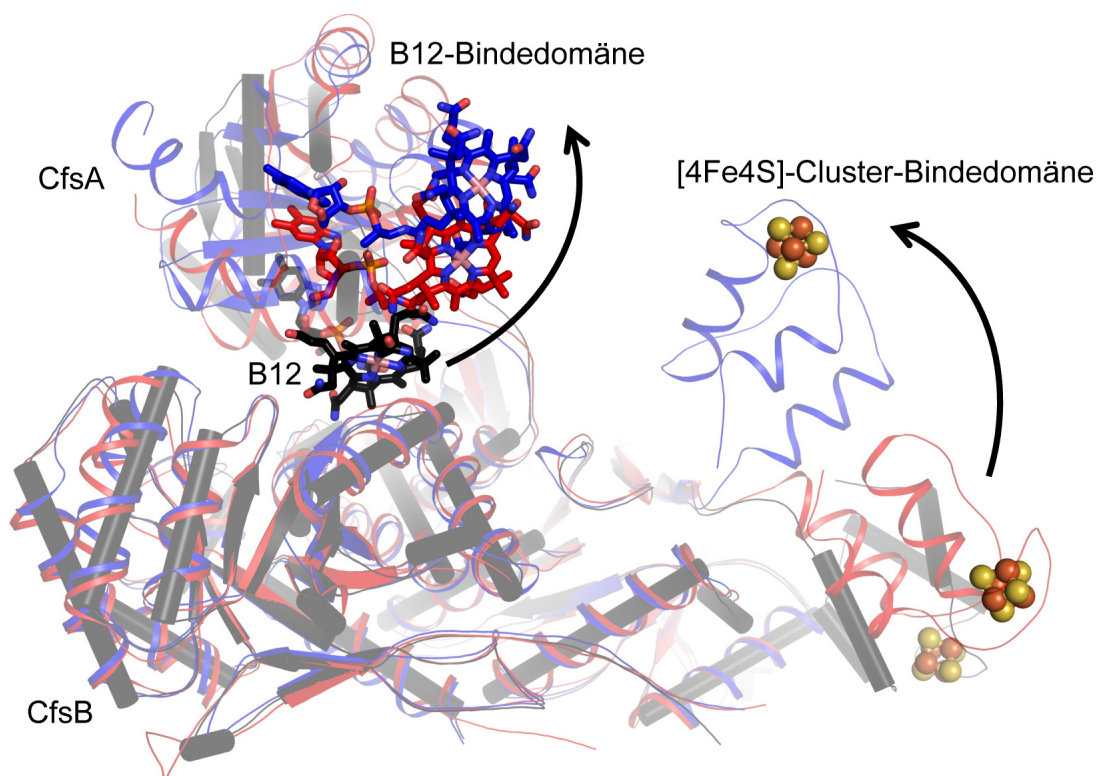


Abbildung 37. Strukturelle Flexibilität von CoFeSP. Für die Abbildung wurden die Kristallstrukturen von CoFeSP_{Ch} (schwarz, PDB-Nummer 2YCL [69]), CoFeSP aus dem CoFeSP:MeTr_{MT}-Komplex (rot, PDB-Nummer 4DJE [100]) und CoFeSP aus dem CoFeSP:RACo-Komplex (blau, [70]) überlagert. Die konformationellen Änderungen der B12- und [4Fe4S]-Cluster-Bindedomänen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Das Co-Ion des Corrinoïd-Kofaktors ist im CoFeSP:MeTr_{Mt}-Komplex um ca. 6,5 Å in Richtung des aktiven Zentrums der MeTr_{Mt} verschoben. Auch die Position des [4Fe4S]-Clusters hat sich, verglichen mit freiem CoFeSP_{Ch}, um ca. 17 Å verändert. Für den CoFeSP-RACo-Komplex wurden anhand der Kristallstruktur entsprechende Abstandsänderungen von 20 und 42 Å beschrieben [70]. Die hier diskutierten Konformationsänderungen scheinen auch eine entscheidende Rolle in anderen cobalaminabhängigen Methyltransfersystemen zu spielen. So werden z.B. bei MetH für die Aktivierung und den Methylgruppentransfer Bewegungen der B12-Bindedomäne von bis zu 50 Å angenommen [84].

3.3 Acetyl-CoA-Synthase

3.3.1 Heterologe Expression und Reinigung

Die **monomere Acetyl-CoA-Synthase** aus *C. hydrogeniformans* wurde heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert. Um eine Schädigung des A-Clusters durch Oxidation zu verhindern, wurden die Kulturgefäße unmittelbar nach Induktion mit Butylsepten luftdicht verschlossen. Aerobe Expressionsversuche hatten zuvor ausschließlich zu inaktiver ACS geführt. Wie in Abbildung 38A zu erkennen, wurde das *acsB*-Gen bereits 1 h nach Induktion deutlich überexprimiert. Nach ca. 20 h wurden die Kulturen unter anoxischen Bedingungen geerntet und durchschnittlich 2 g Nasszellen pro Liter Zellkultur gewonnen.

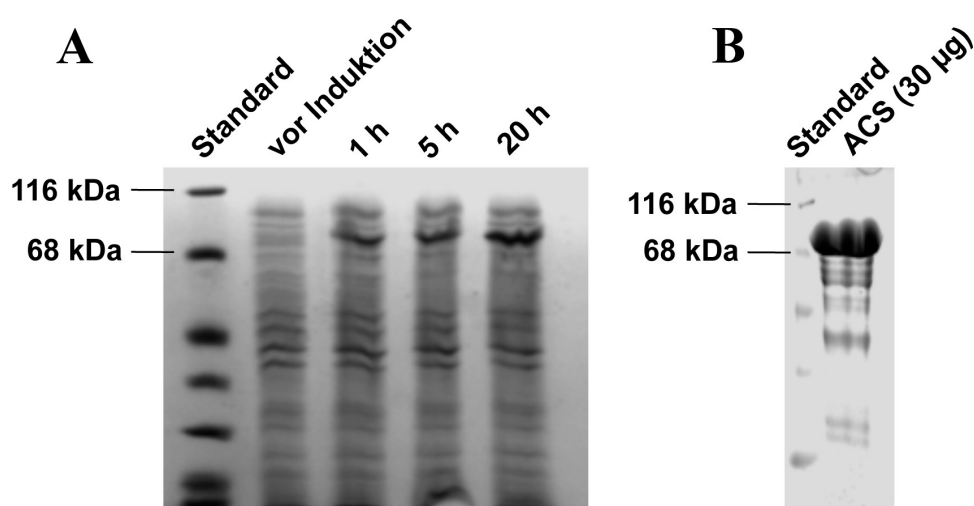


Abbildung 38. Heterologe Expression und Reinigung der ACS. A) zeigt ein 12%iges (w/v) SDS-Polyacrylamidgel der *acsB*-Expression, worauf Proben, die vor Induktion, sowie 1 h, 5 h und 20 h nach Induktion genommen worden waren, aufgetragen wurden. B) 12%iges (w/v) SDS-Polyacrylamidgel, auf das 30 µg der gereinigten ACS aufgetragen wurden. Als Standard dienten jeweils 10 µl eines Molekulargewichtsmarkers (SM0431, Fermentas).

Wie an den von Doukov *et al.* [30] und Darnault *et al.* [31] beschriebenen ACS Kristallstrukturen zu erkennen, wird die proximale Ni-Position des A-Clusters scheinbar leicht durch zweiwertigen Metallionen wie Cu^{2+} und Zn^{2+} besetzt.

Um eine Kontamination des aktiven Zentrums zu verhindern, wurde ACS mit einem N-terminalen Strep-tag produziert, was eine effektive Reinigung mit wenigen Chromatographieschritten ermöglicht. Hierdurch konnte der Kontakt des nicht rekonstituierten Proteins mit metallhaltigen Puffern bzw. Säulenmaterialien minimiert

werden. Anfängliche Versuche, ACS ohne Reinigungs-*tag* oder durch Ni-Affinitätschromatographie zu reinigen, führten zu deutlich weniger aktivem Enzym.

Typischerweise wurden für eine ACS-Reinigung 15 g Zellen verwendet, woraus ca. 20 mg ACS gewonnen wurden. Um einen negativen Einfluss auf Kristallisation und Aktivität auszuschließen, wurde der Strep-*tag* mit TEV-Protease entfernt. Heterolog produzierte ACS eluierte nach ca. 76 ml von der analytischen Gelfiltrationssäule (siehe Anhang, Abbildung A1), was einer theoretischen Molekülmasse von 87 kDa und somit einem ACS Monomer (theoretischer Wert: 82 kDa) in Lösung entspricht. Die Reinheit der ACS wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 38B) und im Hinblick auf eine mögliche Metallkontamination durch weitere Reinigungsschritte für ausreichend befunden.

Die C-terminale Domäne der ACS wurde analog zum vollständigen Enzym produziert (Abbildung 39, links). Jedoch führte die Reinigung mittels Strep-*tag* (Abbildung 39, rechts) bei vergleichbarer Ausbeute zu einer deutlich höheren Reinheit des Proteins. Die analytische Gelfiltration (Anhang, Abbildung A1) zeigte ein Absorptionsmaximum nach 88,5 ml, was einer Molekülmasse von 34 kDa entspricht. Somit liegt auch die C-terminale Domäne der ACS (theoretischer Wert: 26 kDa) in Lösung als Monomer vor.

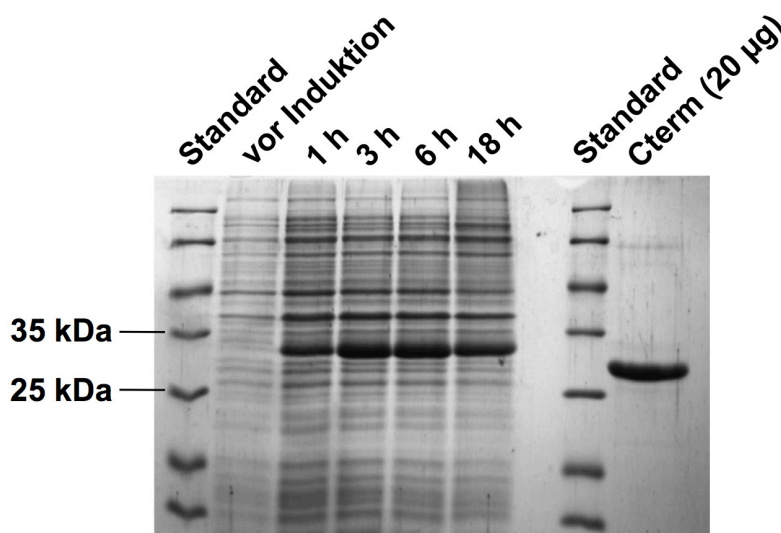


Abbildung 39. Heterologe Produktion und Reinigung der C-terminalen ACS-Domäne. Das 15%ige (w/v) SDS-Polyacrylamidgel zeigt auf der linken Seite Proben der Zellkultur, die vor Induktion, sowie 1 h, 3 h, 6 h und 18 h nach Induktion genommen wurden. Rechts sind 20 µg des gereinigten Proteins aufgetragen, bei dem der Strep-*tag* durch TEV-Protease entfernt wurde. Als Standard dienten je 10 µl Molekulargewichtsmarker (SM0431, Fermentas).

3.3.2 UV/Vis-Spektroskopie

Sowohl ACS als auch deren C-terminale Domäne zeigten unmittelbar nach der Reinigung unter anoxischen Bedingungen UV/Vis-Spektren mit einer leichten Schulter bei 320 nm und einer ausgeprägten Schulter bei 420 nm (Abbildung 40). Dies lässt auf einen oxidierten [4Fe4S]-Cluster schließen [96].

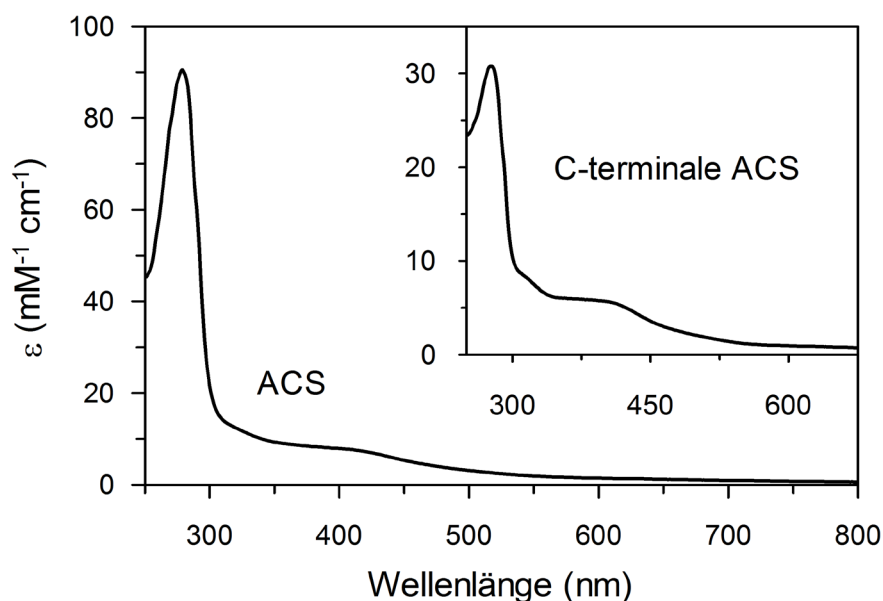


Abbildung 40. UV/Vis-Spektrum der ACS. Die Proteinkonzentration der gereinigten ACS und der C-terminalen ACS-Domäne (*inset*) betrug jeweils 10 μ M in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0).

3.3.3 Metallbindung an ACS

Die Metallgehaltsbestimmung durch Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Haumann (Freie Universität Berlin) durchgeführt. Diese ergab einen durchschnittlichen Fe-Gehalt von 4,1 Fe pro Molekül ACS. Hierfür wurden 8 ACS-Proben analysiert und jeweils doppelt bestimmt. Nickel konnte in den Proben nicht nachgewiesen werden.

Um die Bindung von Ni^{2+} und anderen Metallionen wie Zn^{2+} an ACS besser zu verstehen, wurden ITC-Experimente unter anoxischen Bedingungen durchgeführt (Abbildung 41). Hierfür wurde Protein verwendet, welches unter weitestgehend metallfreien Bedingungen und unter Verwendung EDTA-haltiger Puffer gereinigt worden war.

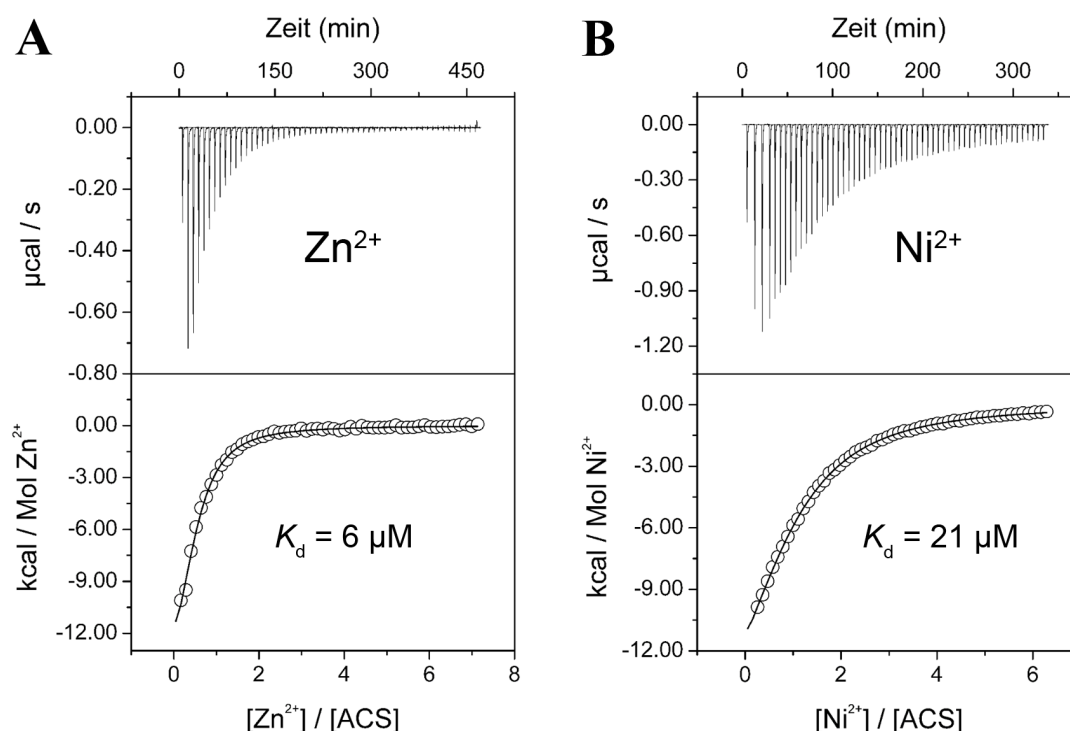


Abbildung 41. ITC-Analyse zur Metallbindung an apo-ACS. Oben ist jeweils die Wärmeänderung jeder Injektion in Abhängigkeit der Zeit gezeigt. Die Peakflächen wurden integriert, auf die Konzentration des jeweiligen Metallions normiert und gegen das molare Verhältnis der beiden Interaktionspartner aufgetragen (untere Darstellung). Die durchgezogene Linie repräsentiert die Anpassung der Daten an ein einfaches Bindungsmodell. A) Titration von 0,75 mM ZnCl_2 zu 25 μM apo-ACS. B) Titration von 0,75 mM NiCl_2 zu 25 μM apo-ACS. Die Messungen erfolgten in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) mit 150 mM NaCl.

Die integrierten Enthalpieänderungen beider Experimente konnten mit einem einfachen Bindungsmodell (eine Bindungsstelle) angepasst werden. Dabei ergab sich für die Titration von Zn^{2+} zu apo-ACS ein K_d -Wert von 6 μM . Für Ni^{2+} wurde unter identischen Bedingungen eine 3,5-fach höhere Dissoziationskonstante ($K_d = 21 \mu\text{M}$) ermittelt, was die Problematik der heterologen ACS-Produktion widerspiegelt. Während die Konzentration an freien Zn- und Cu-Ionen in der Zelle verschwindend gering ist (< 1 Metallion / Zelle [107, 108]) und so nur eine geringe Gefahr der Fehlbesetzung des A-Clusters besteht, sind nahezu alle Reinigungspuffer, Säulenmaterialien und Geräte (z.B. *sonifier*, Glasflaschen, Pipettenspitzen, Säulenmaterialien usw.) mit divalenten Metallionen (vor allem Zn^{2+}) kontaminiert. Der Einbau dieser Metallionen in die proximale Bindestelle führt zu weitreichenden Änderungen an der Gesamtstruktur (siehe geschlossene Konformation in ACS/CODH_{Mt} [31]), sowie an der Koordinationsgeometrie des aktiven Zentrums. Die distale Metallbindestelle scheint aufgrund der starren, quadratisch planaren Koordinationsgeometrie durch das Proteinrückgrat nur von Ni^{2+} besetzt werden zu können.

Die Wärmeänderungen einer Titration von NiCl_2 in apo-ACS, die aus Kulturen mit Minimalmedium stammte, konnten nicht zufriedenstellend durch ein einfaches Bindungsmodell angepasst werden (siehe Abbildung 42).

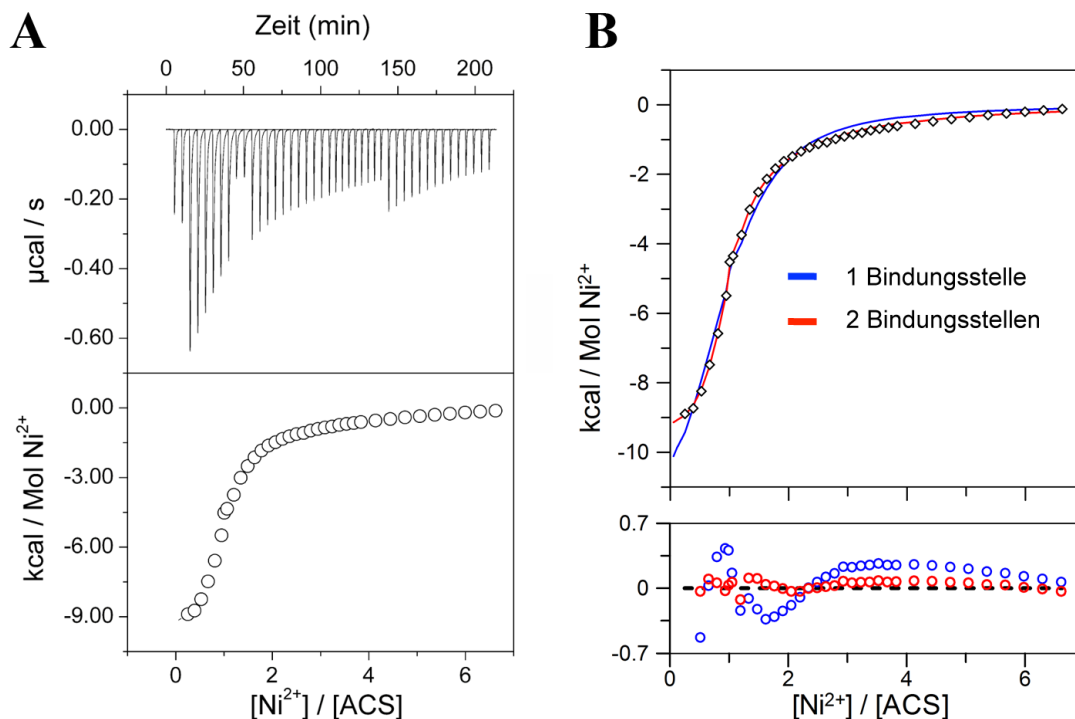


Abbildung 42. ITC-Analyse zur Ni-Bindung an apo-ACS. A) Oben ist die Wärmeänderung jeder Injektion in Abhängigkeit der Zeit gezeigt. Die Peakflächen wurden integriert, auf die Ni^{2+} -Konzentration normiert und gegen das molare Ni/ACS-Verhältnis aufgetragen (untere Darstellung). Die Messung erfolgte in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) mit 150 mM NaCl. B) Anpassung der integrierten Enthalpien mit unterschiedlichen Bindungsmodellen (eine Bindungsstelle: blaue Linie; zwei Bindungsstellen: rote Linie). Darunter sind die jeweiligen Residualplots unter Beibehalt der Farbgebung dargestellt.

Die beste Anpassung wurde durch ein Modell mit zwei Bindungsstellen erzielt, woraus K_d -Werte von $0,75 \mu\text{M}$ ($n = 0,9$; $\Delta H = -9,7 \text{ kcal / Mol}$) für die erste und $29 \mu\text{M}$ (n auf 1 fixiert, $\Delta H = -5,5 \text{ kcal / Mol}$) für die zweite Bindungsstelle resultierten. Aufgrund der „labilen“ Bindungseigenschaft der proximalen Metallbindestelle und der starren Koordination der distalen Stelle durch das Proteinrückgrat ist davon auszugehen, dass es sich bei der Bindestelle mit der niedrigeren Affinität für Ni^{2+} um die proximale Position handelt. Die distale Position scheint bei Standard-Kultivierungsansätzen, im Gegensatz zu ACS aus Minimalmedium, zumindest teilweise durch Ni-Ionen aus dem Kulturmedium besetzt zu sein. Um aktive ACS zu gewinnen, wurde apo-ACS in Analogie zu den ITC-Experimenten mit NiCl_2 -Lösung versetzt und anschließend bei 45°C inkubiert.

3.3.4 Aktivitätsmessung

Um zu testen, ob das rekonstituierte Enzym aktiv ist, wurde die Acetyl-CoA-Bildung, wie von Gencic *et al.* [58] für die ACS-Komponente aus *Methanosarcina thermophila* beschrieben, unter *turnover*-Bedingungen untersucht. Hierfür wurde Methylcobinamid als Methylgruppennonor verwendet, da es wie der Corrinoid-Kofaktor in CoFeSP in der *base-off* Koordination (siehe Abschnitt 1.3.2) vorliegt. Methylcobalamin, bei dem das Co-Ion axial vom Dimethylbenzimidazolrest koordiniert wird (*base-on*), ist als Methylgruppennonor für ACS nur bedingt geeignet und führt zu drastisch verlangsamten Reaktionsraten [33]. Wie in Abbildung 43 gezeigt, kam es unmittelbar nachdem die Reaktion durch Zugabe von CoA gestartet wurde, zu einer raschen Demethylierung von Methylcobinamid. Diese konnte in Analogie zur CoFeSP-Methylierung (Kapitel 3.1.4) anhand der für Cobinamid charakteristischen Co(I)- und CH₃-Co(III)-Absorptionsbanden bei 387 und 462 nm spektral verfolgt werden.

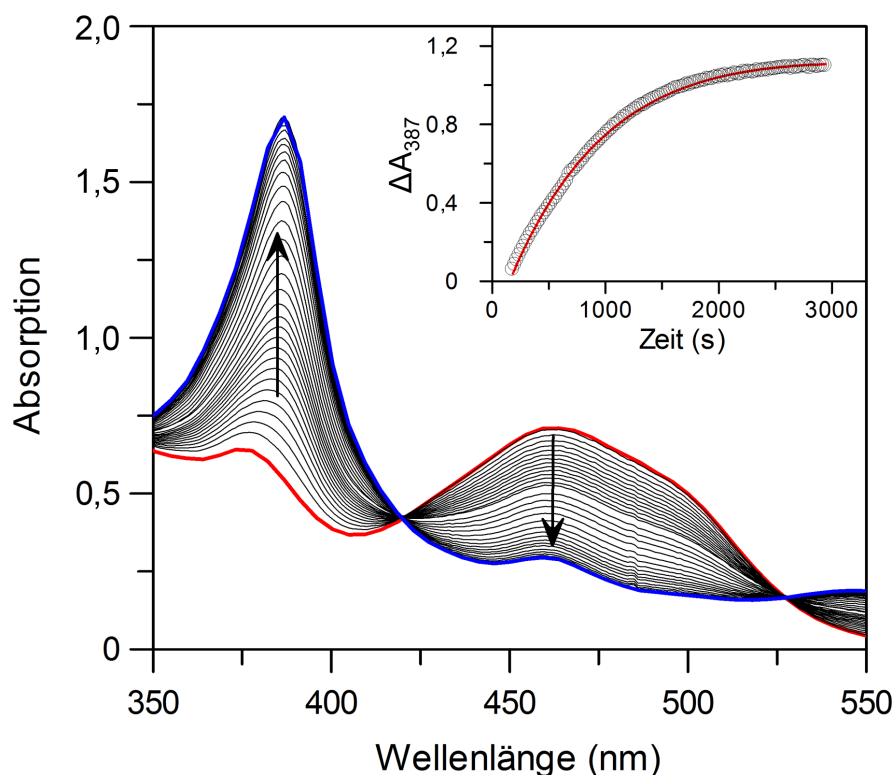


Abbildung 43. Aktivitätstest der ACS. Der Reaktionsansatz enthielt 2 μM ACS, 50 μM Methylcobinamid, 10% (v/v) CO-gesättigtes Wasser, 500 μM Ti(III)citrat und 100 mM Hepes/NaOH (pH 7,2). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 120 μM CoA gestartet und spektral über einen Zeitraum von 3000 s verfolgt. Das *inset* zeigt die Absorptionszunahme bei 387 nm (Co(I)-Cobinamidbildung), welche mit einer Exponentialgleichung (Gleichung 7, $i = 1$) angepasst wurde (rote Linie).

Anhand der Absorptionszunahme bei 387 nm wurde eine spezifische Aktivität von 0,04 μmol umgesetztes Methylcobinamid pro min pro mg ACS (Umsatzrate: 3,4 min^{-1}) berechnet. Damit zeigt die heterolog produzierte ACS_{Ch} unter vergleichbaren Versuchsbedingungen eine ähnliche Umsatzrate wie die isolierte ACS-Komponente aus *M. thermophila* ($\sim 4 \text{ min}^{-1}$, [58]). Zudem liegt die berechnete Aktivität in der selben Größenordnung wie die für die native ACS_{Ch} beschriebene spezifische Acetyl-CoA-Synthese-Aktivität von 0,14 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ [32], wobei beide Werte aufgrund der unterschiedlichen Versuchsparemeter (70 °C, Methylcobalamin in Gegenwart von CoFeSP als Methylgruppendonator) nur bedingt miteinander vergleichbar sind. Dass bei diesem Aktivitätstest tatsächlich Acetyl-CoA gebildet wurde, konnte durch eine HPLC-Analyse nachgewiesen werden (siehe Anhang, Abbildung A11).

Reaktionsansätze ohne CO bzw. CoA zeigten nach ACS Zugabe lediglich einen einfachen Methylgruppentransfer (*single turnover*). Hierbei wurden je nach Enzympräparation bis zu 0,8 Methylgruppen pro ACS-Molekül übertragen. Dies zeigt, dass die Rekonstitution des aktiven Zentrums noch weiter optimiert und die Methylgruppe auch ohne die Anwesenheit der beiden anderen Substrate, CO und CoA, an ACS binden kann.

3.3.5 Kohlenmonoxidbindung an ACS

Um die Bindung von CO an ACS mittels ITC zu untersuchen, wurde rekonstituiertes, DT-reduziertes Enzym mit CO-gesättigtem Puffer titriert (siehe Abbildung 44). Durch die Anpassung der Bindungsisotherme konnte ein K_d -Wert von 8 μM bestimmt werden. Damit liegt die Affinität für CO in derselben Größenordnung, wie die der ACS-Untereinheit aus *M. thermoacetica*. Für diese war anhand einer ESR-Titration ein K_d -Wert von 30 μM ermittelt worden [109]. Die Bindungsstöchiometrie von 0,8 Mol CO pro Mol ACS stimmt gut mit der Anzahl der maximal übertragbaren Methylgruppen aus dem *single turnover*-Experiment (siehe Abschnitt 3.3.4) überein.

Somit scheinen sowohl CO, als auch die Methylgruppe, unabhängig voneinander an die ACS binden zu können. Die Reihenfolge, in der die Substrate im ACS-Reaktionszyklus an das Enzym binden, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden und wird unter Abschnitt 3.3.8 im strukturellen Kontext weiter diskutiert.

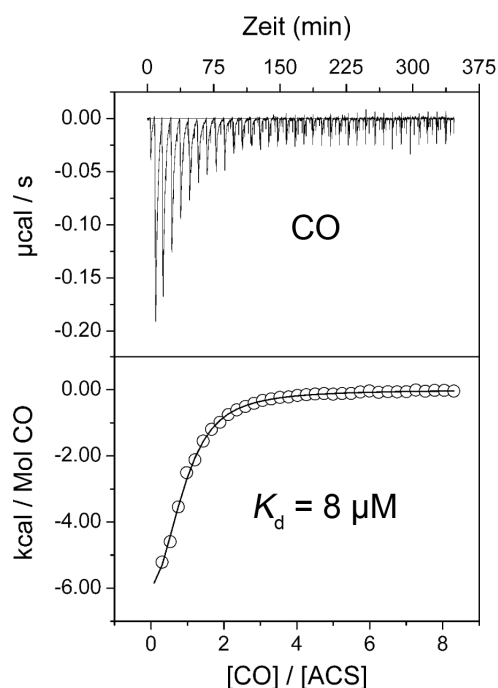


Abbildung 44. ITC-Analyse zur CO-Bindung an ACS. Dabei wurde 1 mM CO-Lösung unter anoxischen Bedingungen zu 20 μM ACS titriert. Oben ist die Wärmeänderung jeder Injektion in Abhängigkeit der Zeit gezeigt. Die Peakflächen wurden integriert, auf die CO-Konzentration normiert und gegen das molare CO/ACS-Verhältnis aufgetragen (untere Darstellung). Die durchgezogene Linie repräsentiert die Anpassung der Daten an ein einfaches Bindungsmodell. Die Messung erfolgte in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) mit 1 mM DT.

3.3.6 Kleinwinkelstreuung der ACS

In Analogie zu MeTr und CoFeSP wurden auch für ACS Kleinwinkelstreuexperimente durchgeführt. Die anhand der Streukurven ermittelte Molekülmasse von 83 kDa spricht, in Übereinstimmung mit der analytischen Gelfiltration und der von Svetlitchnyi *et al.* gelösten Kristallstruktur (PDB-Nummer: 1RU3 [32]), für ein funktionelles Monomer. Über den gemessenen Konzentrationsbereich konnten anhand der experimentellen Streukurven keine Änderungen des oligomeren Zustands oder Präzipitatbildung festgestellt werden (siehe Anhang, Abbildung A3). Das anhand der Streukurven erstellte *ab initio*-Modell der ACS (Abbildung 45A) zeigt eine schlechte Übereinstimmung mit der Kristallstruktur ($\chi^2 = 7,118$). Die gestreckte Form des *ab initio*-Modells lässt sich deutlich besser mit einem länglichen Modell der ACS beschreiben ($\chi^2 = 2,152$), bei dem die C- und N-terminalen Domänen nicht miteinander wechselwirken (Abbildung 45B). Verglichen mit der offenen und geschlossenen Konformation würde eine derart lineare Form der ACS die Zugänglichkeit des A-Clusters deutlich erhöhen. Zudem scheint es hinsichtlich der zahlreichen Interaktionspartner (CODH,

CoFeSP, evtl. Ferredoxin, potentielle Maturasen oder Nickel-Insertasen) durchaus plausibel, dass ACS in Lösung eine flexible Ausgangskonformation mit schwachen Wechselwirkungen zwischen den beweglichen Domänen besitzt.

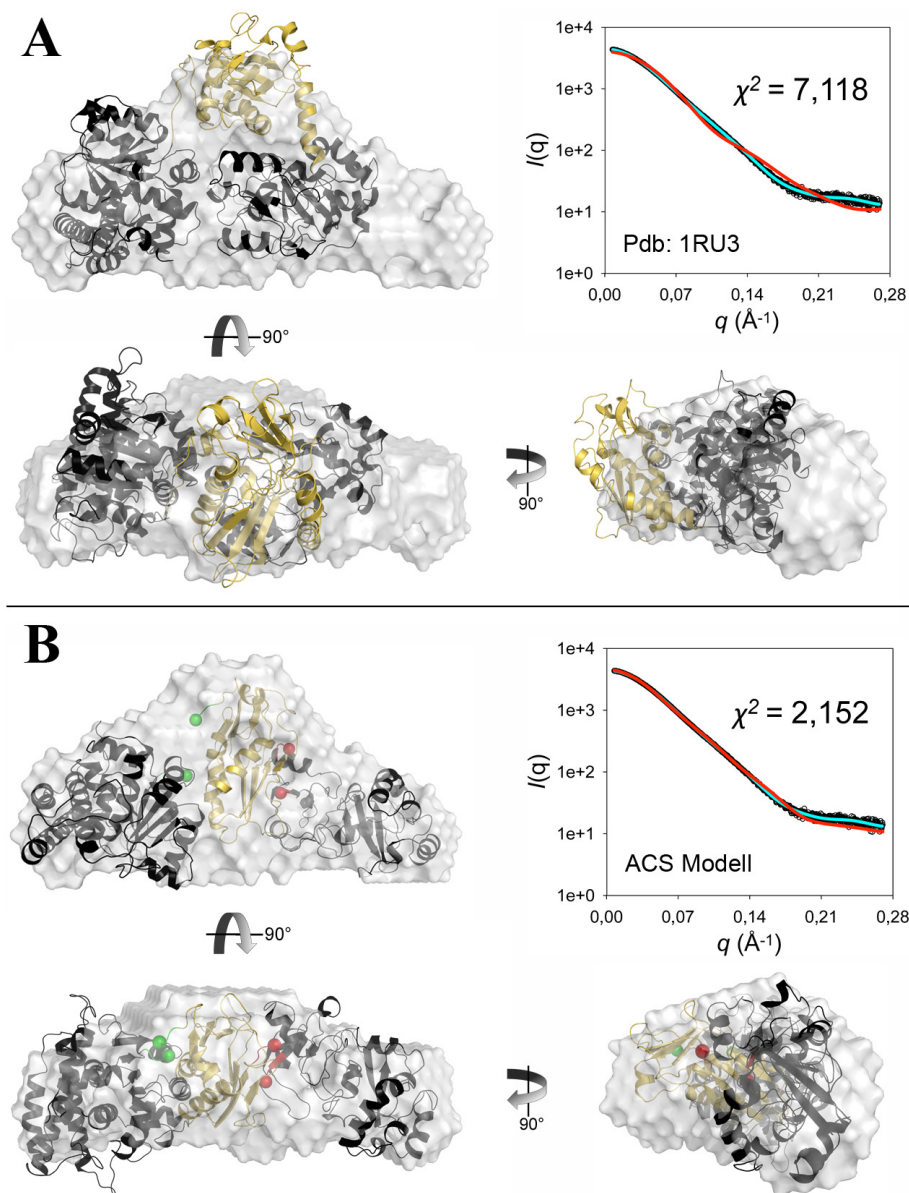


Abbildung 45. *Ab initio*-Modell der ACS. Die Streukurven der ACS wurden mit PRIMUS [62] verschmolzen und mittels GNOM [63] prozessiert. Das *ab initio*-Modell (graue Oberflächendarstellung) wurde unter Verwendung der Programme GASBOR [65] und DAMclust [66] erstellt. A) Überlagerung des *ab initio*-Modells mit der Kristallstruktur der monomeren ACS (PDB-Nummer: 1RU3 [32]). Letztere ist als Bändermodell dargestellt, wobei die N- und C-terminalen Domänen schwarz und die mittlere Domäne golden gefärbt sind. B) Überlagerung des *ab initio*-Modells mit einem gestreckten Modell der ACS, welches mit pyDock [110] erstellt wurde. Die flexiblen *linker*-Regionen wurden für das Modell entfernt. Grüne bzw. rote Kugeln markieren die zusammengehörigen Termini der benachbarten Domänen. Die *insets* zeigen die jeweiligen prozessierten Rohdaten (schwarze Kreise), die zugehörige GNOM-Anpassung (türkise Linie) und eine simulierte Streukurve der Kristallstruktur bzw. des pyDock-Modells (rote Linie).

Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die längliche Form des *ab initio*-Modells auf einer oxidativen Schädigung des Enzyms beruht. Die Proben wurden zwar unter Ausschluss von Sauerstoff präpariert und eingefroren, mussten jedoch apparaturbedingt unmittelbar vor der Messung geöffnet werden. Hierdurch war die Enzymlösung bis zum Ende der Messung ca. 4 min lang dem Luftsauerstoff ausgesetzt. Ähnlich wie bei der geschlossenen ACS-Konformation könnte auch eine oxidative Schädigung des A-Clusters zu strukturellen Umlagerungen und zu einer gestreckten Form des Enzyms führen.

Um ACS vor Sauerstoff zu schützen, könnte das Kleinwinkelstreuexperiment, wie von Ando *et al.* [15] für CoFeSP_{Mt} beschrieben, unter Verwendung spezieller luftdichter Kunststoffzellen wiederholt werden. Eine lineare Form der ACS in Lösung könnte auch durch Abstandsmessungen mittels Einzelmolekül-FRET nachgewiesen werden.

3.3.7 Kristallisation und Struktur der C-terminalen Domäne

Weder durch „neue“ ACS-Kristalle aus systematischen Screens, noch durch die Reproduktion bekannter Kristallisationsbedingungen konnten für ACS Datensätze mit höherer Auflösung als die der nativen ACS_{Ch}-Struktur (PDB-Nummer 1RU3, Auflösung 2,2 Å [32]) erzeugt werden. Selbst durch den Einsatz verschiedener Reduktionsmittel und *additive*-Screens, sowie durch die Dehydratisierung der Kristalle durch hohe Salzkonzentrationen konnte eine Auflösung von 3,0 Å nicht unterschritten werden. Um jedoch strukturelle Details zur Geometrie des A-Clusters oder die Bindung kleiner Liganden wie CO oder der Methylgruppe zu analysieren, bedarf es einer deutlich höheren Auflösung.

Die offensichtlichsten Gründe für die schlechten Röntgenbeugungseigenschaften der ACS sind deren strukturelle Flexibilität und die Inhomogenität des A-Clusters. Um die Beweglichkeit der drei durch *linker*-Regionen verbundenen ACS-Domänen zu umgehen, wurde die C-terminale ACS-Domäne, welche den A-Cluster koordiniert, analog zum vollständigen Enzym isoliert und mit NiCl₂ rekonstituiert. Ein *screening* nach neuen Kristallisationsbedingungen für die C-terminale Domäne ergab zahlreiche Treffer in überwiegend salzhaltigen Bedingungen. Dabei zeigten die bräunlichen Kristalle eine meist kubische oder hexagonale Form und besaßen einen Durchmesser von ca. 0,1 - 0,3 mm (siehe Abbildung 46).

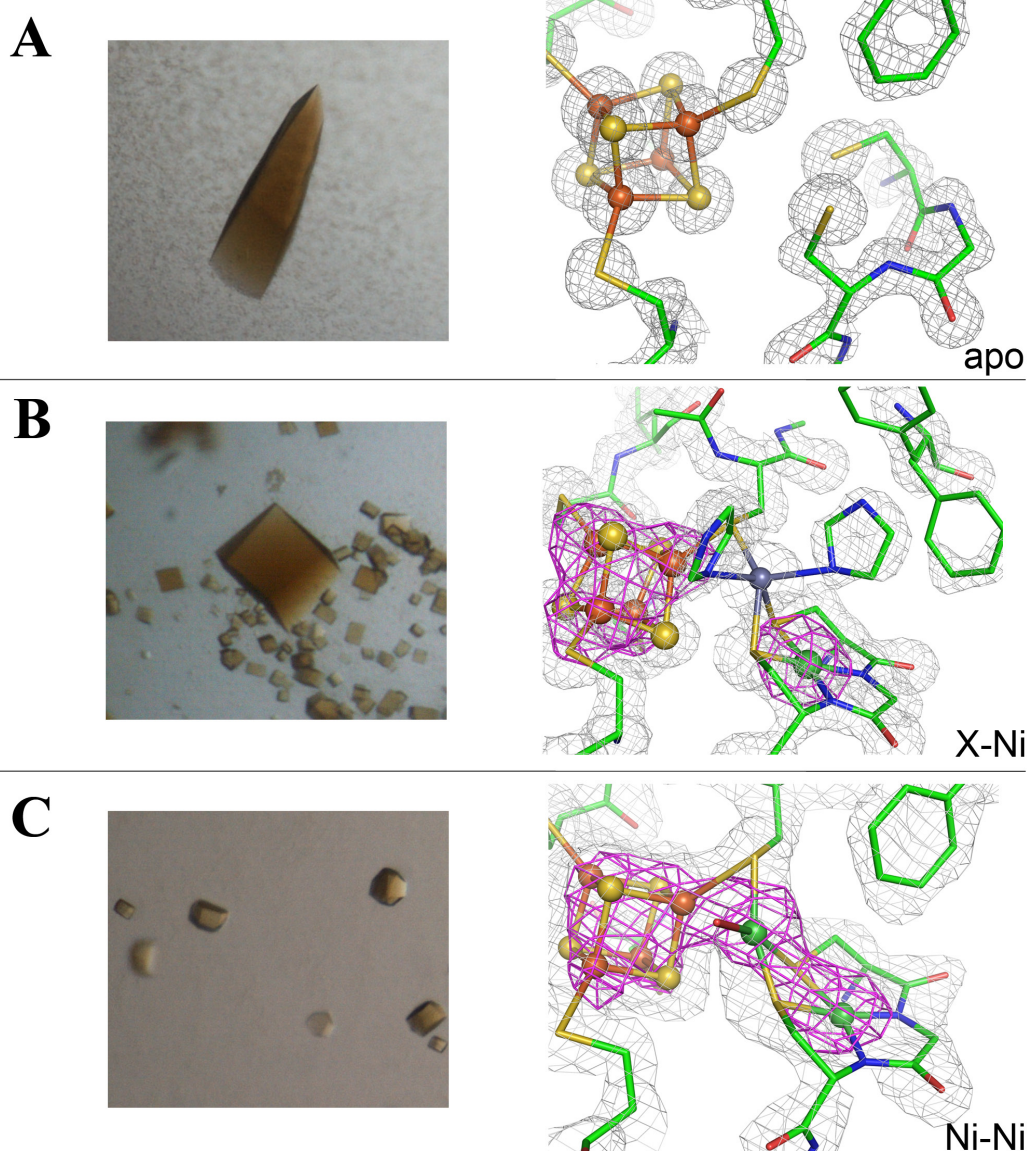


Abbildung 46. Kristallisation der C-terminalen ACS-Domäne. Für alle Ansätze wurde die mit NiCl_2 rekonstituierte C-terminale Domäne (20 mg/ml) verwendet. Auf der linken Seite sind die jeweiligen Kristalle abgebildet, wohingegen rechts das aktive Zentrum der ACS des zugehörigen Datensatzes gezeigt ist. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarten sind als graue Maschen und anomale Fourier-Differenzkarten (höherenergetische Seite der Nickelkante) als lila Maschen dargestellt. A) Kristall aus SaltRX Screen (Hampton Research), Bedingung B3 (1 M Ammoniumcitrat, 0,1 M Natriumacetat trihydrat, pH 4,6). Der Datensatz (Auflösung 1,33 Å) zeigt nur einen $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster ohne bimetallisches Zentrum („apo“, Konturlevel der $2F_o - F_c$ -Karte: 2,0 σ). B) Kristalle aus dem Wizard II *random sparse matrix* Screen (Emerald BioSystems), Bedingung H10 (1M Diammoniumhydrogenphosphat, 0,1 M Imidazol, pH 8,0, 0,2 M NaCl). Der Datensatz (Auflösung 1,61 Å) zeigt ein bimetallisches Zentrum, von dem nur die distale Position mit Nickel („X-Ni“) besetzt ist (Konturlevel der $2F_o - F_c$ -Karte: 2,0 σ ; anomale Fourier-Differenzkarte: 6,0 σ). C) Kristallisationsbedingung wie bei B), unter Verwendung metallfreier Kristallisationslösungen. Der Datensatz (Auflösung 2,4 Å) zeigt zwei Ni im aktiven Zentrum („Ni-Ni“, Konturlevel der $2F_o - F_c$ -Karte: 1,5 σ ; anomale Fourier-Differenzkarte: 5,5 σ).

Diese Kristalle waren in der Lage, Röntgenstrahlen bis zu einer maximalen Auflösung von 1,3 Å zu beugen, 0,6 Å besser als jede bis dahin veröffentlichte Struktur der ACS. Jedoch zeigte sich bei Kristallisationsbedingungen mit hoher Citratkonzentration ($> 1\text{ M}$), dass beide Metallionen vermutlich nachträglich aus dem A-Cluster gezogen wurden („apo“, Abbildung 46A). Der [4Fe4S]-Cluster hingegen war in allen Kristallstrukturen der C-terminalen Domäne vorhanden. Bei einer anderen Kristallisationsbedingung, für die Protein der gleichen Präparation verwendet wurde, zeigte sich eine nicht mit Nickel besetzte proximale Bindungsstelle (Abbildung 46B).

Um zu testen, ob diese Inhomogenität auf die Proteinreinigung oder auf die verwendeten Kristallisationspuffer zurückzuführen ist, wurden Optimierungsansätze auf 24-*well* Platten im *hanging-drop*-Verfahren unter Verwendung metallfreier Puffer und Präzipitanzlösungen durchgeführt. Zunächst konnten unter diesen Bedingungen nur kleine Kristalle ($< 0,1\text{ mm}$) gezüchtet werden, die Röntgenstrahlung mit einer maximalen Auflösung von 2,4 Å beugten (Abbildung 46C). Ein Datensatz dieser Kristalle zeigte, dass beide Metallbindungsstellen besetzt waren und in Analogie zur Ni-Ni-haltigen Struktur der ACS_{Ch} eine quadratisch planare Koordinationsgeometrie aufwiesen. Ein Datensatz, der auf der höherenergetischen Seite der Nickel-K-Kante aufgenommen wurde, zeigte ein anomales Signal für beide Positionen. Somit ist davon auszugehen, dass beide Bindungsstellen mit Ni-Ionen besetzt sind.

Um eine höhere Auflösung der Ni-Ni-haltigen C-terminalen ACS-Struktur zu erzielen, wurde die Kristallisation systematisch durch die Variation der Präzipitanz- und NaCl-Konzentration weiter optimiert. Hierdurch konnten schließlich größere, kubische Kristalle mit einer Kantenlänge von ca. 0,3 mm erhalten werden. Diese führten zu einem Datensatz mit einer maximalen Auflösung von 1,4 Å. Die Statistiken der Datensammlung und Verfeinerung sind im Anhang, Tabelle A4 beschrieben. Des Weiteren wurden Datensätze auf der höherenergetischen ($\lambda = 1,475\text{ Å}$) und niederenergetischen Seite ($\lambda = 1,550\text{ Å}$) der Ni-K-Kante ($\lambda = 1,488\text{ Å}$) aufgenommen. Hierdurch konnte für beide Metallbindungsstellen Nickel nachgewiesen werden.

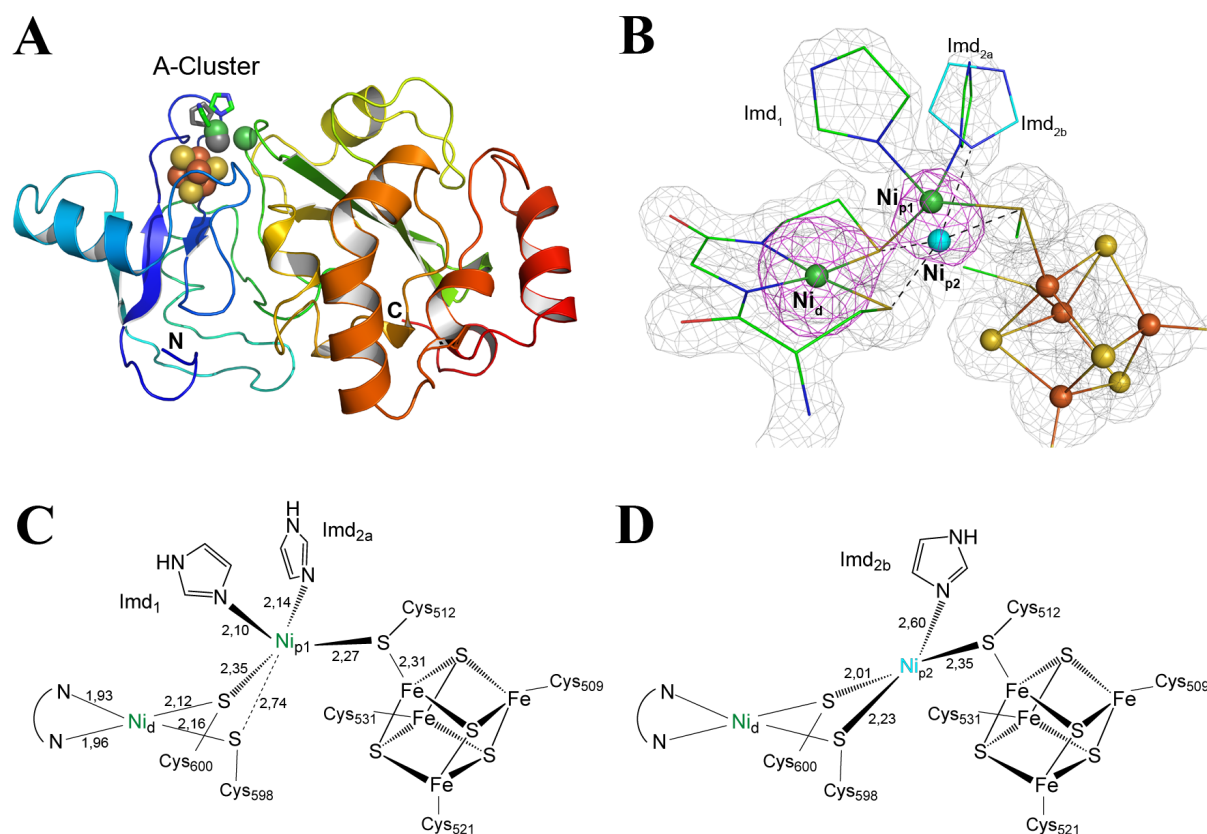


Abbildung 47. Struktur der C-terminalen ACS-Domäne. A) Das Protein (Bänderdarstellung) ist kontinuierlich vom N-Terminus in blau über grün und gelb zum C-Terminus in rot gefärbt. Schwefelatome sind als gelbe, Eisenatome als rote und Nickelatome als grüne Kugeln dargestellt. Die koordinierenden Imidazolreste sind als Stäbchenmodell gezeigt. Eine alternative Konformation des proximalen Ni mit koordinierendem Imidazol ist in grau abgebildet. B) A-Cluster der C-terminalen ACS-Domäne ($d_{\min} = 1,4 \text{ \AA}$). Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte (Konturlevel $2,0 \sigma$) ist in grau dargestellt. Es wurden Datensätze bei $\lambda = 1,475 \text{ \AA}$ (höherenergetische Seite der Ni-K-Kante) und $\lambda = 1,550 \text{ \AA}$ (niederenergetische Seite der Ni-K-Kante) aufgenommen und eine anomale Differenzfourier-Synthese der Differenz der anomalen Strukturfaktoramplituden ($|F_{\text{ano}1,475\text{\AA}}| - |F_{\text{ano}1,550\text{\AA}}|$) berechnet (lila, Konturlevel $7,5 \sigma$). Die alternative Konformation des proximalen Ni (Ni_{p2}) und die zugehörige Konformation des koordinierenden Imidazols (Imd_{2b}) sind türkis gefärbt. Die beiden Konformationen des A-Clusters sind schematisch in C) (verzerrt-tetraedrisch koordiniertes Ni_{p1}) und D) (quadratisch-planar koordiniertes Ni_{p2}) dargestellt. Bindungslängen sind in Å angegeben. Die gemessenen Winkel sind im Anhang, Tabelle A5 zusammengefasst.

Die Verfeinerung des Strukturmodells zeigte zwei unterschiedliche Konformationen des proximalen Nickels (Verhältnis $\sim 85:15$), in denen jeweils Imidazol aus dem Kristallisationspuffer als Ligand agiert (siehe Abbildung 47A und B). Die vorherrschende Konformation (Abbildung 47C) kann am besten als verzerrt-tetraedrische 4+1 Koordination

beschrieben werden. Ni_p wird dabei neben zwei Imidazolringen (Imd1 und Imd2a), Cys512 und Cys600 mit Bindungslängen zwischen 2,10 und 2,35 Å auch schwach von Cys599 mit einer Bindungslänge von 2,74 Å koordiniert. Der Imidazolligand Imd1 befindet sich unmittelbar an der Öffnung des potentiellen CO-Tunnels, wohingegen der andere (Imd2a) zur Solvens-zugänglichen Seite des A-Clusters zeigt. Obwohl es sich bei Imidazol nicht um physiologische Liganden des proximalen Nickels handelt, könnte die hier beobachtete Geometrie einen intermediären Zustand des ACS-Reaktionszyklus widerspiegeln. Es wird davon ausgegangen, dass unmittelbar vor Bildung der Acetylgruppe sowohl CO, als auch die Methylgruppe gleichzeitig an Ni_p gebunden sind [4]. Dies würde sich vermutlich, ähnlich wie hier beschrieben, in einer 5-fachen, nicht-planaren Koordination des proximalen Nickels äußern.

Die weniger besetzte Konformation (Abbildung 47D) zeigt, wie auch die Kristallstrukturen von ACS_{Ch} (PDB-Nummer 1RU3 [32]) und ACS_{Mt} (PDB-Nummer 1OAO [31]), zwei quadratisch-planar koordinierte Ni-Ionen. Jedoch wird hier Ni_p durch einen Imidazolliganden (Imd2b) anstelle eines Wassermoleküls koordiniert.

Bezogen auf die Gesamtstruktur sind die hier beschriebenen Kristallstrukturen der C-terminalen ACS-Domäne und die der entsprechenden Untereinheit des vollständigen Enzyms sehr ähnlich (siehe Abbildung 48A).

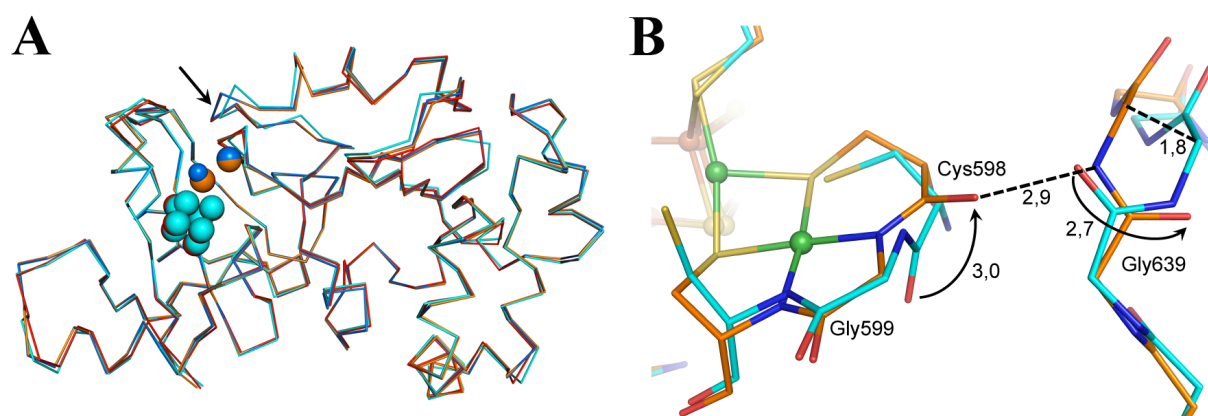


Abbildung 48. Vergleich der Kristallstrukturen der C-terminalen ACS-Domäne. A) Überlagerung der apo- (türkis), X-Ni- (blau) und Ni-Ni-haltigen (rot) Struktur mit der C-terminalen Domäne der vollständigen ACS-Struktur (orange, PDB-Nummer 1RU3 [32]). Der A-Cluster ist jeweils in der entsprechenden Farbe des Proteinrückgrates als Kugelmodell dargestellt. Die Position der loop-Region um Gly639 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. B) Überlagerung des aktiven Zentrums der apo- (türkis) und Ni-Ni-haltigen Struktur der C-terminalen ACS-Domäne (orange). Abstände sind in Å angegeben.

Die größten strukturellen Änderungen zeigen sich beim Vergleich der Ni-Ni-haltigen ACS und der apo-Form der C-terminalen Domäne mit einer *r.m.s.*-Abweichung von 0,46 Å bezüglich der C α -Atome. Eine Überlagerung beider Strukturen (Abbildung 48B) verdeutlicht, dass die Bindung der Ni-Atome nicht nur die koordinierenden Cysteinseitenketten (Cys598 und Cys600), sondern auch das Proteinrückgrat an der distalen Bindestelle stark beeinflusst. So wird Gly599 durch eine Drehung um den Diederwinkel Φ ($\Delta\Phi = -111^\circ$) in eine nach Ramachandran „nicht erlaubte“ Konformation gezwungen. Das benachbarte Cys598 wird durch die Ni $_d$ -Koordination ebenfalls stark verdreht ($\Delta\Phi = 26^\circ$, $\Delta\psi = 105^\circ$). Diese Koordinationsgeometrie wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff von Cys598 und dem Amid-Stickstoff von Gly639 (benachbarter *loop*, Distanz: 2,9 Å) stabilisiert. Hierzu wird dieses, verglichen mit der apo-Form, ebenfalls um nahezu 180° ($\Delta\psi = -177^\circ$) gedreht und die *loop*-Region um ca. 1,8 Å verschoben. Diese strukturellen Unterschiede könnten eine wichtige Rolle bei der Erkennung des apo-Zustandes und der Wechselwirkung mit Maturasen der ACS spielen. Über die am Ni-Einbau beteiligten Proteine ist bislang sehr wenig bekannt. Jedoch kodiert der *acs*-Gencluster von *C. hydrogenoformans* (siehe Abschnitt 1.4) für ein Protein mit unbekannter Funktion (CooC2), das analog zu CooC1, welches vermutlich als Ni-Insertase für CODH dient ([46, 47]), an der Maturation des A-Clusters beteiligt sein könnte. Ein Aminosäuresequenzvergleich (siehe Anhang, Abbildung A12) zeigt, dass CooC2 homolog zu AcsF aus *M. thermoacetica* ist, für welches von Loke und Lindahl eine Rolle als Ni-Insertase für ACS_{Mt} vorgeschlagen wurde [111].

Neben den beschriebenen strukturellen Unterschieden wurden in den Kristallstrukturen der C-terminalen ACS-Domäne auch verschiedene Konformationen eines Phenylalanins (Phe515) beobachtet, die im folgenden Kapitel näher beschrieben und diskutiert werden.

3.3.8 Konformationen des Phe515

Kürzlich wurde eine erweiterte Variante des diamagnetischen Reaktionsmechanismus beschrieben. [112]. Hierbei wurde die Rolle eines konservierten Phenylalanins (Phe195 der ACS-Komponente in *M. thermophila*) hinsichtlich der Reihenfolge der Substratbindung diskutiert. Dieses Phe scheint in der offenen ACS-Konformation [31] den potenziellen Gaskanal zwischen ACS und CODH über Ni $_p$ zu blockieren. Hierdurch wäre eine CO-Bindung aus Richtung der CODH sterisch gehindert, wohingegen die Methylgruppe nach wie

vor von der Solvens-zugänglichen Seite des A-Clusters von CoFeSP auf Ni_p übertragen werden könnte. Gencic *et al.* schlugen vor, dass die Methylgruppe zuerst bindet und ACS anschließend durch eine strukturelle Umlagerung in die geschlossene Konformation (siehe Abschnitt 1.3.5) übergeht, wodurch sich die Phe-Seitenkette aus der Koordinationssphäre des Ni_p bewegen soll [31, 32]. Somit wäre der potenzielle Gaskanal geöffnet und eine CO-Bindung an methyliertes Ni_p sterisch möglich. Allerdings konnte der geschlossene Zustand bislang nur für inaktives Enzym in Cu- oder Zn-haltigen Strukturen gezeigt werden.

In den hier beschriebenen Strukturen wurden insgesamt drei verschiedene Konformationen des entsprechenden Phenylalanins (Phe515) beobachtet (siehe Abbildung 49A und B).

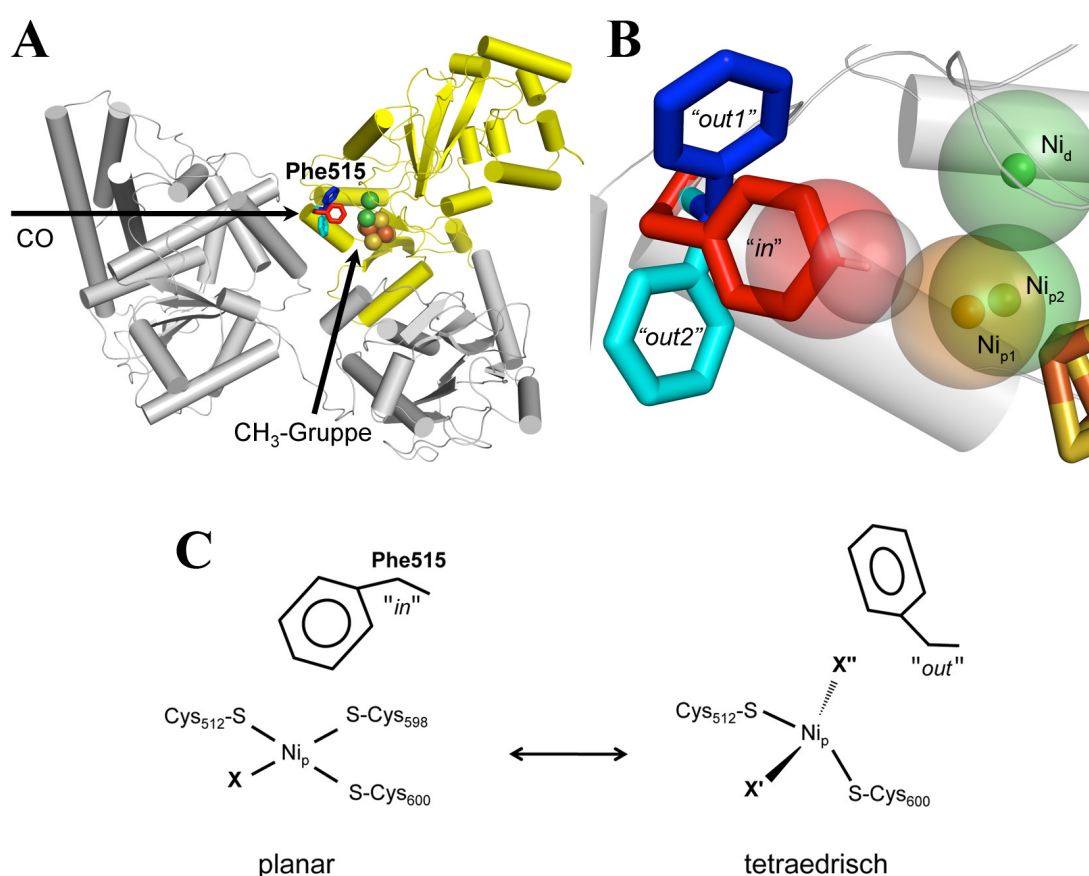


Abbildung 49. Konformationen des Phe515. A) Die Struktur der C-terminalen Domäne (Ni-Ni , planar) ist als gelbes Bändermodell dargestellt. Die theoretischen Positionen der mittleren und N-terminalen Domänen der Ni-Ni -haltigen ACS_{Ch} (PDB-Nummer 1RU3) sind in grau dargestellt. Die beobachteten Konformationen des Phe515 sind als Stäbchenmodelle in blau, rot und türkis abgebildet. Pfeile zeigen die Richtungen an, aus der vermutlich die CO-, bzw. Methylgruppenbindung erfolgt. B) Clash der Ni_{p1} und Phe515 „in“ Konformation. Die Van der Waals Radien der Ni-Atome und der dem Ni_p am nächsten kommende C-H-Gruppe des Phe515 sind als transparente Kugeln dargestellt. Die quadratisch planar koordinierten Ni (Ni_d und Ni_{p2}) sind grün und das tetraedrisch koordinierte Ni_{p1} orange gefärbt. C) Schematische Darstellung der planaren und tetraedrischen Ni_p -Koordination. X kennzeichnet mögliche Liganden in der planaren Konformation, X' und X'' bezeichnen Liganden in der tetraedrischen Form.

In Strukturen mit einer quadratisch planaren Koordinationsgeometrie des Ni_p , sowie in der apo-Form, zeigt die Seitenkette des Phe515 analog zur offenen ACS-Struktur [31] in Richtung der proximalen Bindungsstelle („*in*“-Konformation, Abbildung 49B und C).

Die Struktur mit dem verzerrt-tetraedrisch koordinierten Ni_p hingegen zeigt zwei alternative Phe515-Konformationen („*out1*“ und „*out2*“). Diese liegen beide außerhalb der Ni-Koordinationssphäre und würden einen Gaskanal zwischen ACS und CODH nicht blockieren. Dabei entspricht „*out1*“ der Phe-Konformation, die man auch in der geschlossenen ACS-Struktur [31] findet. „*Out2*“ hingegen würde in der Gesamtstruktur der ACS mit Ile149 der N-terminalen Domäne kollidieren und ist daher vermutlich nur in Strukturen der isolierten C-terminalen Domäne zu finden.

Wie in Abbildung 49B dargestellt, würden die Van der Waals Radien von Ni_{p1} und Phe515 in der „*in*“-Konformation überlappen. Somit scheint bei einer tetraedrischen Koordination des Ni_p , welche vermutlich nach CO-Bindung und im Übergangszustand mit zwei Substraten vorliegt, nur die „*out*“-Konformation möglich zu sein (Abbildung 49C, rechts).

Anhand der hier beschriebenen Kristallstrukturen ist ein Reaktionsmechanismus, bei dem die Methylgruppe zuerst bindet [112], auch bei ACS_{Ch} möglich. Jedoch müsste hierfür ein annähernd planarer, reaktiver Ni_p^0 - oder Ni_p^+ -Ausgangszustand angenommen werden, um die Phe515 „*in*“-Konformation für den ersten Reaktionsschritt zu ermöglichen. Obwohl für Ni^0 und Ni^+ trigonal planare Komplexverbindungen bekannt sind [113, 114], liegt Ni in beiden Oxidationszuständen für gewöhnlich tetraedrisch koordiniert vor [115, 116]. Eine tetraedrische Ausgangskoordination des Ni_p würde zur „*out*“-Konformation des Phe515 führen und die Methylgruppen- und CO-Bindung gleichermaßen erlauben.

4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zum Verständnis der finalen Schritte des reduktiven Acetyl-CoA-Weges beitragen und gleichzeitig eine vielversprechende Basis für weiterführende Experimente schaffen.

An MeTr gebundenes MeTHF scheint durch eine Protonierung der N5-Position aktiviert zu werden. Um diesen Mechanismus zu bestätigen, wären Aussagen über den Protonierungszustand des MeTHF, sowie der koordinierenden MeTr-Reste von großer Hilfe. Dafür könnten die hier für Röntgenbeugung verwendeten Proteinkristalle weiter optimiert und für Neutronenbeugungsexperimente verwendet werden.

Die strukturelle Flexibilität von CoFeSP konnte erstmals durch ortsspezifische Markierung mit Fluoreszenz-, bzw. Spinmarkern auch in Lösung nachgewiesen werden. Anders als bei den statischen Kristallstrukturen lassen sich hierdurch auch Rückschlüsse auf die Kinetik der Komplexbildung der Proteine ziehen. Neben der Interaktion mit RACo könnte die für CoFeSP beschriebene Strategie auch zur Analyse der Wechselwirkungen mit MeTr und ACS verwendet werden. Durch die ortsspezifische Kopplung von *crosslink*-Reagenzien an die CoFeSP-Variante könnten auch transiente Proteinkomplexe analysiert, isoliert und kristallisiert werden.

Die C-terminale Domäne der ACS wurde analog zum vollständigen Enzym gereinigt und rekonstituiert. Durch die Kristallisation und systematische Optimierung der Kristallisationsbedingungen konnten hochaufgelöste Strukturen des A-Clusters bestimmt werden. Durch *soaking*-Experimente oder Kokristallisation kann nun versucht werden, die nicht-physiologischen Imidazolliganden an Ni_p durch Substrate zu ersetzen, um weitere Einblicke in den Mechanismus der ACS zu gewinnen.

5 Literatur

- [1] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Brock, T. D.: Brock biology of microorganisms, 11. Auflage. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River (2006).
- [2] Hügler, M., Sievert, S. M.: Beyond the Calvin Cycle: Autotrophic Carbon Fixation in the Ocean. *Ann Rev Mar Sci* **3**, 261–89 (2011).
- [3] Aresta, M.: *Carbon Dioxide as Chemical Feedstock*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2010).
- [4] Ragsdale, S. W.: Nickel and the carbon cycle. *J Inorg Biochem* **101**, 1657–66 (2007).
- [5] Ragsdale, S. W.: Life with carbon monoxide. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**, 165–95 (2004).
- [6] Berg, I. A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B. E., Fuchs, G.: Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat Rev Microbiol* **8**, 447–60 (2010).
- [7] Ragsdale, S. W.: Enzymology of the acetyl-CoA pathway of CO₂ fixation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **26**, 261–300 (1991).
- [8] Ragsdale, S. W.: The eastern and western branches of the Wood/Ljungdahl pathway: how the east and west were won. *Biofactors* **6**, 3–11 (1997).
- [9] Ragsdale, S. W.: Enzymology of the Wood-Ljungdahl Pathway of Acetogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1125**, 129–36 (2008).
- [10] Ragsdale, S. W., Pierce, E.: Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 1873–98 (2008).
- [11] Dekleva, T. W., Forster, D.: Mechanistic Aspects of Transition-Metal-Catalyzed Alcohol Carbonylations. *Adv in Cat* **34**, 81–130 (1986).
- [12] Jones, J. H.: The Cativa™ Process for the Manufacture of Acetic Acid. *Platin Met Rev* **44**, 94–105 (2000).
- [13] Koutmos, M., Datta, S., Patridge, K. A., Smith, J. L., Matthews, R. G.: Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18527–32 (2009).
- [14] Doukov, T., Seravalli, J., Stezowski, J. J., Ragsdale, S. W.: Crystal structure of a methyltetrahydrofolate- and corrinoid-dependent methyltransferase. *Structure* **8**, 817–30 (2000).

- [15] Ando, N., Kung, Y., Can, M., Bender, G., Ragsdale, S. W., Drennan, C. L.: Transient B12-Dependent Methyltransferase Complexes Revealed by Small-Angle X-ray Scattering. *J Am Chem Soc* **134**, 17945–54 (2012).
- [16] Doukov, T. I., Hemmi, H., Drennan, C. L., Ragsdale, S. W.: Structural and kinetic evidence for an extended hydrogen-bonding network in catalysis of methyl group transfer. Role of an active site asparagine residue in activation of methyl transfer by methyltransferases. *J Biol Chem* **282**, 6609–18 (2007).
- [17] Seravalli, J., Zhao, S., Ragsdale, S. W.: Mechanism of transfer of the methyl group from (6S)-methyltetrahydrofolate to the corrinoid/iron-sulfur protein catalyzed by the methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum*: a key step in the Wood-Ljungdahl pathway of acetyl-CoA synthesis. *Biochemistry* **38**, 5728–35 (1999).
- [18] Seravalli, J., Shoemaker, R. K., Sudbeck, M. J., Ragsdale, S. W.: Binding of (6R,S)-methyltetrahydrofolate to methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum*: role of protonation of methyltetrahydrofolate in the mechanism of methyl transfer. *Biochemistry* **38**, 5736–45 (1999).
- [19] Svetlitchnaia, T., Svetlitchnyi, V., Meyer, O., Dobbek, H.: Structural insights into methyltransfer reactions of a corrinoid iron-sulfur protein involved in acetyl-CoA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14331–36 (2006).
- [20] Harder, S. R., Lu, W. P., Feinberg, B. A., Ragsdale, S. W.: Spectroelectrochemical studies of the corrinoid/iron-sulfur protein involved in acetyl coenzyme A synthesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* **28**, 9080–87 (1989).
- [21] Menon, S., Ragsdale, S. W.: The role of an iron-sulfur cluster in an enzymatic methylation reaction. Methylation of CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase by the methylated corrinoid iron-sulfur protein. *J Biol Chem* **274**, 11513–18 (1999).
- [22] Hennig, S. E., Jeoung, J.-H., Goetzl, S., Dobbek, H.: Redox-dependent complex formation by an ATP-dependent activator of the corrinoid/iron-sulfur protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5235–40 (2012).
- [23] Buss, K. A., Cooper, D. R., Ingram-Smith, C., Ferry, J. G., Sanders, D. A., Hasson, M. S.: Urkinase: structure of acetate kinase, a member of the ASKHA superfamily of phosphotransferases. *J Bacteriol* **183**, 680–86 (2001).
- [24] Meister, W., Hennig, S. E., Jeoung, J.-H., Lendzian, F., Dobbek, H., Hildebrandt, P.: Complex Formation with the Activator RACo Affects the Corrinoid Structure of CoFeSP. *Biochemistry* **51**, 7040–42 (2012).

- [25] Meyer, O., Gremer, L., Ferner, R., Ferner, M., Dobbek, H., Gnida, M., Meyer-Klaucke, W., Huber, R.: The role of Se, Mo and Fe in the structure and function of carbon monoxide dehydrogenase. *Biol Chem* **381**, 865–76 (2000).
- [26] Ferry, J. G.: CO dehydrogenase. *Ann Rev Microbiol* **49**, 305–33 (1995).
- [27] Ragsdale, S. W., Kumar, M.: Nickel-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenase / Acetyl-CoA Synthase. *Chem Rev* **96**, 2515–40 (1996).
- [28] Jeoung, J.-H., Dobbek, H.: Carbon dioxide activation at the Ni₂Fe-cluster of anaerobic carbon monoxide dehydrogenase. *Science* **318**, 1461–64 (2007).
- [29] Lindahl, P. A.: The Ni-containing carbon monoxide dehydrogenase family: light at the end of the tunnel? *Biochemistry* **41**, 2097–105 (2002).
- [30] Doukov, T. I., Iverson, T. M., Seravalli, J., Ragsdale, S. W., Drennan, C. L.: A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Science* **298**, 567–72 (2002).
- [31] Darnault, C., Volbeda, A., Kim, E. J., Legrand, P., Vernede, X., Lindahl, P. A., Fontecilla-Camps, J. C.: Ni-Zn-Fe₄-S₄ and Ni-Ni-Fe₄-S₄ clusters in closed and open subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nat Struct Biol* **10**, 271–79 (2003).
- [32] Svetlitchnyi, V., Dobbek, H., Meyer-Klaucke, W., Meins, T., Thiele, B., Romer, P., Huber, R., Meyer, O.: A functional Ni-Ni-4Fe-4S cluster in the monomeric acetyl-CoA synthase from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 446–51 (2004).
- [33] Gencic, S., Grahame, D. A.: Nickel in subunit beta of the acetyl-CoA decarbonylase/synthase multienzyme complex in methanogens. Catalytic properties and evidence for a binuclear Ni-Ni site. *J Biol Chem* **278**, 6101–10 (2003).
- [34] Hegg, E. L.: Unraveling the structure and mechanism of acetyl-coenzyme A synthase. *Acc Chem Res* **37**, 775–83 (2004).
- [35] Seravalli, J., Gu, W., Tam, A., Strauss, E., Begley, T. P., Cramer, S. P., Ragsdale, S. W.: Functional copper at the acetyl-CoA synthase active site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3689–94 (2003).
- [36] Tan, X., Sewell, C., Yang, Q., Lindahl, P. A.: Reduction and methyl transfer kinetics of the alpha subunit from acetyl coenzyme a synthase. *J Am Chem Soc* **125**, 318–19 (2003).

- [37] Seravalli, J., Kumar, M., Ragsdale, S. W.: Rapid kinetic studies of acetyl-CoA synthesis: evidence supporting the catalytic intermediacy of a paramagnetic NiFeC species in the autotrophic Wood-Ljungdahl pathway. *Biochemistry* **41**, 1807–19 (2002).
- [38] Schenker, R. P., Brunold, T. C.: Computational studies on the A cluster of acetyl-coenzyme A synthase: geometric and electronic properties of the NiFeC species and mechanistic implications. *J Am Chem Soc* **125**, 13962–63 (2003).
- [39] Bender, G., Stich, T. A., Yan, L., Britt, R. D., Cramer, S. P., Ragsdale, S. W.: Infrared and EPR Spectroscopic Characterization of a Ni(I) Species Formed by Photolysis of a Catalytically Competent Ni(I)-CO Intermediate in the Acetyl-CoA Synthase Reaction. *Biochemistry* **49**, 7516–23 (2010).
- [40] Thauer, R. K.: Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology* **144**, 2377–406 (1998).
- [41] Barondeau, D. P., Lindahl, P. A.: Methylation of Carbon Monoxide Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum* and Mechanism of Acetyl Coenzyme A Synthesis. *J Am Chem Soc* **119**, 3959–70 (1997).
- [42] Svetlichny, V. A., Sokolova, T. G., Gerhardt, M., Ringpfel, M., Kostrikina, N. A., Zavarzin, G. A.: *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* gen. nov., sp. nov., a CO-utilizing Thermophilic Anaerobic Bacterium from Hydrothermal Environments of Kunashir Island. *Syst Appl Microbiol* **14**, 254–60 (1991).
- [43] Wu, M., Ren, Q., Durkin, A. S., Daugherty, S. C., Brinkac, L. M., Dodson, R. J., Madupu, R., Sullivan, S. A., Kolonay, J. F., Haft, D. H., Nelson, W. C., Tallon, L. J., Jones, K. M., Ulrich, L. E., Gonzalez, J. M., Zhulin, I. B., Robb, F. T., Eisen, J. A.: Life in hot carbon monoxide: the complete genome sequence of *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* Z-2901. *PLoS Genet* **1** (2005).
- [44] Svetlitchnyi, V., Peschel, C., Acker, G., Meyer, O.: Two membrane-associated NiFeS-carbon monoxide dehydrogenases from the anaerobic carbon-monoxide-utilizing eubacterium *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*. *J Bacteriol* **183**, 5134–44 (2001).
- [45] Roberts, D. L., James-Hagstrom, J. E., Garvin, D. K., Gorst, C. M., Runquist, J. A., Baur, J. R., Haase, F. C., Ragsdale, S. W.: Cloning and expression of the gene cluster encoding key proteins involved in acetyl-CoA synthesis in *Clostridium thermoaceticum*: CO dehydrogenase, the corrinoid/Fe-S protein, and methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 32–36 (1989).
- [46] Jeoung, J.-H., Giese, T., Grünwald, M., Dobbek, H.: Crystal Structure of the ATP-Dependent Maturation Factor of Ni,Fe-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenases. *J Mol Biol* **396**, 1165–79 (2010).

- [47] Jeoung, J.-H., Giese, T., Grünwald, M., Dobbek, H.: CooC1 from Carboxydotherrmus hydrogeniformans Is a Nickel-Binding ATPase. *Biochemistry* **48**, 11505–13 (2009).
- [48] Klock, H. E., Lesley, S. A.: *The Polymerase Incomplete Primer Extension (PIPE) Method Applied to High-Throughput Cloning and Site-Directed Mutagenesis*. In: Walker, J. M.; Doyle, S. A. (Hrsg.): *High Throughput Protein Expression and Purification*. Humana Press, Totowa (2009).
- [49] Sambrook, J., Russell, D.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
- [50] Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–54 (1976).
- [51] Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A: *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. Humana Press (2005).
- [52] Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–85 (1970).
- [53] Fish, W. W.: Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* **158**, 357–64 (1988).
- [54] Menon, S., Ragsdale, S. W.: Role of the 4Fe-4S cluster in reductive activation of the cobalt center of the corrinoid iron-sulfur protein from *Clostridium thermoaceticum* during acetate biosynthesis. *Biochemistry* **37**, 5689–98 (1998).
- [55] Dawson, R. M. C: *Data for biochemical research*, 3. Auflage. Clarendon Press, Oxford (1989).
- [56] Wilkinson, K.: *Quantitative Analysis of Protein-Protein Interactions*. In: Fu, H. (Hrsg.): *Protein-Protein Interactions*. Humana Press (2004).
- [57] Massey, V., Hemmerich, P.: A photochemical procedure for reduction of oxidation-reduction proteins employing deazariboflavin as catalyst. *J Biol Chem* **252**, 5612–14 (1977).
- [58] Gencic, S., Grahame, D. A.: Two Separate One-Electron Steps in the Reductive Activation of the A Cluster in Subunit β of the ACDS Complex in *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry* **47**, 5544–55 (2008).
- [59] Robertson, W. D., Bovell, A. M., Warncke, K.: Cobinamide production of hydrogen in a homogeneous aqueous photochemical system, and assembly and photoreduction in a $(\beta\alpha)_8$ protein. *J Biol Inorg Chem* **18**, 701–13 (2013).

- [60] Fukada, H., Takahashi, K.: Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins* **33**, 159–66 (1998).
- [61] Lobo, B. A., Koe, G. S., Koe, J. G., Middaugh, C. R.: Thermodynamic analysis of binding and protonation in DOTAP/DOPE (1:1): DNA complexes using isothermal titration calorimetry. *Biophys Chem* **104**, 67–78 (2003).
- [62] Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, Michel H. J., Svergun, D. I.: PRIMUS. A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* **36**, 1277–82 (2003).
- [63] Svergun, D. I.: Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Crystallogr* **25**, 495–503 (1992).
- [64] Fischer, H., de Oliveira Neto, M., Napolitano, H. B., Polikarpov, I., Craievich, A. F.: Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. *J Appl Crystallogr* **43**, 101–09 (2010).
- [65] Svergun, D. I., Petoukhov M. V., Koch, M. H. J.: Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering. *Biophys J* **80**, 2946–53 (2001).
- [66] Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, Haydyn D. T., Konarev, P. V., Svergun, D. I.: New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* **45**, 342–50 (2012).
- [67] Svergun, D., Barberato, C., Koch, M. H. J.: CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *J Appl Crystallogr* **28**, 768–73 (1995).
- [68] Jeschke, G., Chechik, V., Ionita, P., Godt, A., Zimmermann, H., Banham, J., Timmel, C. R., Hilger, D., Jung, H.: DeerAnalysis2006—a comprehensive software package for analyzing pulsed ELDOR data. *Appl Magn Reson* **30**, 473–498 (2006).
- [69] Goetzl, S., Jeoung, J.-H., Hennig, S. E., Dobbek, H.: Structural basis for electron and methyl-group transfer in a methyltransferase system operating in the reductive acetyl-CoA pathway. *J Mol Biol* **411**, 96–109 (2011).
- [70] Hennig, S. E., Goetzl, S., Jeoung, J.-H., Bommer, M., Lendzian, F., Hildebrandt, P., Dobbek, H.: ATP-induced protein-protein electron transfer by redox-selective partner recognition. *Zur Veröffentlichung eingereicht* (2014).
- [71] Polyhach, Y., Bordignon, E., Jeschke, G.: Rotamer libraries of spin labelled cysteines for protein studies. *Phys Chem Chem Phys* **13**, 2356–66 (2011).

- [72] Leslie, A. G. W., Powell, H. R.: *Processing diffraction data with mosflm*. In: Read, R. J.; Sussman, J. L. (Hrsg.): *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*. Springer Verlag, Dordrecht (2007).
- [73] Kabsch, W.: Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 133–44 (2010).
- [74] McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., Read, R. J.: Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658–74 (2007).
- [75] Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., Cowtan, K.: Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486–501 (2010).
- [76] Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H., Adams, P. D.: Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**, 352–67 (2012).
- [77] Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J.: Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240–55 (1997).
- [78] Schrödinger, L. L.: *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1* (2010).
- [79] Holm, L., Rosenstrom, P.: Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38** (2010).
- [80] Zhao, S., Ragsdale, S. W.: A conformational change in the methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum* facilitates the methyl transfer from (6S)-methyltetrahydrofolate to the corrinoid/iron-sulfur protein in the Acetyl-CoA pathway. *Biochemistry* **35**, 2476–81 (1996).
- [81] Zhao, S., Roberts, D. L., Ragsdale, S. W.: Mechanistic studies of the methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum*: origin of the pH dependence of the methyl group transfer from methyltetrahydrofolate to the corrinoid/iron-sulfur protein. *Biochemistry* **34**, 15075–83 (1995).
- [82] Matthews, R. G.: Cobalamin-dependent methyltransferases. *Acc Chem Res* **34**, 681–89 (2001).
- [83] Smith, A. E., Matthews, R. G.: Protonation state of methyltetrahydrofolate in a binary complex with cobalamin-dependent methionine synthase. *Biochemistry* **39**, 13880–90 (2000).

-
- [84] Evans, J. C., Huddler, D. P., Hilgers, M. T., Romanchuk, G., Matthews, R. G., Ludwig, M. L.: Structures of the N-terminal modules imply large domain motions during catalysis by methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3729–36 (2004).
- [85] Baker, B. M., Murphy, K. P.: Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. *Biophys J* **71**, 2049–55 (1996).
- [86] Alonso, H., Cummins, P. L., Gready, J. E.: Methyltetrahydrofolate:corrinoid/iron-sulfur protein methyltransferase (MeTr): protonation state of the ligand and active-site residues. *J Phys Chem B* **113**, 14787–96 (2009).
- [87] Jarrett, J. T., Choi, C. Y., Matthews, R. G.: Changes in protonation associated with substrate binding and Cob(I)alamin formation in cobalamin-dependent methionine synthase. *Biochemistry* **36**, 15739–48 (1997).
- [88] Koutmos, M., Pejchal, R., Bomer, T. M., Matthews, R. G., Smith, J. L., Ludwig, M. L.: Metal active site elasticity linked to activation of homocysteine in methionine synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3286–91 (2008).
- [89] Hevener, K. E., Yun, M.-K., Qi, J., Kerr, I. D., Babaoglu, K., Hurdle, J. G., Balakrishna, K., White, S. W., Lee, R. E.: Structural studies of pterin-based inhibitors of dihydropteroate synthase. *J Med Chem* **53**, 166–77 (2010).
- [90] Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., McCammon, J. A.: Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10037–41 (2001).
- [91] Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G.: Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–48 (2007).
- [92] Cummins, P. L., Gready, J. E.: Energetically most likely substrate and active-site protonation sites and pathways in the catalytic mechanism of dihydrofolate reductase. *J Am Chem Soc* **123**, 3418–28 (2001).
- [93] Howell, E. E., Villafranca, J. E., Warren, M. S., Oatley, S. J., Kraut, J.: Functional role of aspartic acid-27 in dihydrofolate reductase revealed by mutagenesis. *Science* **231**, 1123–28 (1986).
- [94] Fedorov, A., Shi, W., Kicska, G., Fedorov, E., Tyler, P. C., Furneaux, R. H., Hanson, J. C., Gainsford, G. J., Larese, J. Z., Schramm, V. L., Almo, S. C.: Transition state structure of purine nucleoside phosphorylase and principles of atomic motion in enzymatic catalysis. *Biochemistry* **40**, 853–60 (2001).

- [95] Kicska, G. A., Tyler, P. C., Evans, G. B., Furneaux, R. H., Shi, W., Fedorov, A., Lewandowicz, A., Cahill, S. M., Almo, S. C., Schramm, V. L.: Atomic dissection of the hydrogen bond network for transition-state analogue binding to purine nucleoside phosphorylase. *Biochemistry* **41**, 14489–98 (2002).
- [96] Lippard S. J., Berg J. M.: *Bioanorganische Chemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1995).
- [97] Ragsdale, S. W., Lindahl, P. A., Munck, E.: Mossbauer, EPR, and optical studies of the corrinoid/iron-sulfur protein involved in the synthesis of acetyl coenzyme A by *Clostridium thermoaceticum*. *J Biol Chem* **262**, 14289–97 (1987).
- [98] Brondino, C. D., Romao, M. J., Moura, I., Moura, Jose J G: Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family. *Curr Opin Chem Biol* **10**, 109–14 (2006).
- [99] Dobbek, H.: Structural aspects of mononuclear Mo/W-enzymes. *Molybdenum* **255**, 1104–16 (2011).
- [100] Kung, Y., Ando, N., Doukov, T. I., Blasiak, L. C., Bender, G., Seravalli, J., Ragsdale, S. W., Drennan, C. L.: Visualizing molecular juggling within a B12-dependent methyltransferase complex. *Nature* **484**, 265–69 (2012).
- [101] Rye, H. S.: Application of fluorescence resonance energy transfer to the GroEL-GroES chaperonin reaction. *Methods* **24**, 278–88 (2001).
- [102] Roy, R., Hohng, S., Ha, T.: A practical guide to single-molecule FRET. *Nat Methods* **5**, 507–16 (2008).
- [103] Koshland, D. E.: Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**, 98–104 (1958).
- [104] Eigen, M.: Determination of general and specific ionic interactions in solution. *Discuss Faraday Soc* **24**, 25–36 (1957).
- [105] Galletto, R., Jezewska, M. J., Bujalowski, W.: Kinetics of allosteric conformational transition of a macromolecule prior to ligand binding: analysis of stopped-flow kinetic experiments. *Cell Biochem Biophys* **42**, 121–44 (2005).
- [106] Tsvetkov, Y. D., Milov, A. D., Maryasov, A. G.: Pulsed electron–electron double resonance (PELDOR) as EPR spectroscopy in nanometre range. *Russ Chem Rev* **77**, 487 (2008).
- [107] Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C., O'Halloran, T. V.: Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**, 805–08 (1999).

- [108] Outten, C. E., O'Halloran, T. V.: Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**, 2488–92 (2001).
- [109] Tan, X., Loke, H.-K., Fitch, S., Lindahl, P. A.: The tunnel of acetyl-coenzyme A synthase/carbon monoxide dehydrogenase regulates delivery of CO to the active site. *J Am Chem Soc* **127**, 5833–39 (2005).
- [110] Jimenez-Garcia, B., Pons, C., Fernandez-Recio, J.: pyDockWEB: a web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring. *Bioinformatics* **29**, 1698–99 (2013).
- [111] Loke, H.-K., Lindahl, P. A.: Identification and preliminary characterization of AcsF, a putative Ni-insertase used in the biosynthesis of acetyl-CoA synthase from *Clostridium thermoaceticum*. *J Inorg Biochem* **93**, 33–40 (2003).
- [112] Gencic, S., Kelly, K., Ghebreamlak, S., Duin, E. C., Grahame, D. A.: Different Modes of Carbon Monoxide Binding to Acetyl-CoA Synthase and the Role of a Conserved Phenylalanine in the Coordination Environment of Nickel. *Biochemistry* (2013).
- [113] Jonas, K., Pörschke, K. R., Krüger, C., Tsay, Y.-H.: Carbanion-Komplexe von Nickel(0). *Angew Chem* **88**, 682 (1976).
- [114] Deppisch, B., Schaefer, H.: Uebergangsmetallphosphidokomplexe. VI. Die Struktur von Bis(m-bis(trimethylsilyl)phosphido)-bis(trimethylphosphinnickel) $[\text{Me}_3\text{PNiP}(\text{SiMe}_3)_2]_2$, einem phosphidoverbrueckten Phosphinkomplex mit trigonal planar koordiniertem Nickel(I). *Z Anorg Allg Chem* **490**, 129–35 (1982).
- [115] Matsumoto, T., Ito, M., Kotera, M., Tatsumi, K.: A dinuclear nickel complex modeling of the Ni(d)(II)-Ni(p)(I) state of the active site of acetyl CoA synthase. *Dalton Trans* **39**, 2995–97 (2010).
- [116] Bennett, M. A., Chiraratvatana, C., Robertson, G. B., Tooptakong, U.: Tetrahedral complexes of nickel(0) and platinum(0) containing a chelating olefinic tertiary phosphine. Synthesis, reactivity, and x-ray crystal structures of $\text{M}(\text{o-CH}_2\text{:CHC}_6\text{H}_4\text{PPh}_2)_2$ (M = Ni, Pt). *Organometallics* **7**, 1394–402 (1988).

6 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
ACES	<i>N</i> -(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure
ACS	Acetyl-CoA-Synthase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASKHA	Acetat- und Zuckerkinasen, Hsc70 und Actin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. hydrogenoformans</i>	<i>Carboxydotherrnus hydrogenoformans</i>
Cam	Chloramphenicol
Cb	Carbenicilin
Cfs	CoFeSP Untereinheit
CoA	Coenzym A
CODH	Kohlenmonoxid-Dehydrogenase
CoFeSP	Corrinoid/Eisen-Schwefel Protein
C-term	C-terminale Domäne der ACS
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DT	Natriumdithionit
DTPA	Diethylenetriaminpentaessigsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz
FAD	Flavinadenindinukleotid
F ₄₂₀ H ₂	Coenzym F ₄₂₀ (reduziert)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K _m	Kanamycin
LB	Luria-Bertani

<i>M. thermoacetica</i>	<i>Moorella thermoacetica</i>
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethanesulfonsäure
MetH	Methionin-Synthase
MeTHF	5-Methyl-Tetrahydrofolat
MeTr	Methyltransferase
MeTr _{Ch}	Methyltransferase aus <i>C. hydrogenoformans</i>
MeTr _{Mt}	Methyltransferase aus <i>M. thermoacetica</i>
mTB Medium	modifiziertes <i>terrific-broth</i> Medium
MTS	1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl-methanthiosulfonsäure
NADH	Nicotinamidadenin dinukleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinamidadenin dinukleotidphosphat (reduziert)
PAGE	Polyacrylamid gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein-Datenbank
PEG	Polyethylenglycol
PELDOR	gepulste Elektronendoppelresonanz
PEP	Phosphoenolpyruvat
P _i	Anorganisches Phosphat
PIPE	<i>Polymerase Incomplete Primer Extension</i>
RACo	Reduktiver Aktivator von CoFeSP
<i>r.m.s.</i>	<i>root mean square</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase / Oxygenase
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>terrific-broth</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylen-diamin
Tet	Tetracyclin
TEV	<i>Tabacco Etch Virus</i>
THF	Tetrahydrofolat
TIM	Triosephosphatisomerase
Tricin	<i>N</i> -(Tris(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

TRXF	Total-Reflexions-Röntgen-Fluoreszenz-Spektroskopie
UV/Vis	Ultravioletter und sichtbarer Bereich
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen

7 Anhang

7.1 Weitere Tabellen

Tabelle A1. Statistiken der Datensammlung und Modellverfeinerung für MeTr (nach [69]).

<i>Datensammlung</i>	MeTr (nativ)	MeTr (mit MeTHF)	MeTr (mit THF)
Wellenlänge (Å)	0,91841	0,91841	0,91841
Raumgruppe	$P4_32_12$	$P4_32_12$	$P4_32_12$
Zellkonstanten			
$a; b; c$ (Å)	64,0; 64,0; 176,2	64,7; 64,7; 177,3	64,0; 64,0; 175,1
$\alpha; \beta; \gamma$ (°)	90; 90; 90	90; 90; 90	90; 90; 90
Beobachtete ^a / einzigartige Reflexe ^a	250.403 / 35.890	209.201 / 27.851	78.588 / 20.410
R_s^a (%)	3,3 (56,1)	4,2 (50,8)	4,6 (57,2)
Auflösung (Å) ^a	35 – 1,78 (1,83 – 1,78)	35 – 1,96 (2,01 – 1,96)	35 – 2,15 (2,21 – 2,15)
Vollständigkeit (%) ^a	99,4 (99,7)	99,6 (99,8)	98,9 (99,5)
$I/\sigma I^a$	30,6 (2,8)	27,3 (4,3)	18,5 (2,6)
<i>Verfeinerung</i>			
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}(\%)^{a,b,c}$	19,1 / 23,3	20,0 / 23,9	17,6 / 23,2
<i>r.m.s.</i> -Abweichung			
Bindungslänge (Å)	0,016	0,008	0,007
Bindungswinkel (°)	1,535	1,329	1,055
Ramachandran Statistik (%)			
Favorisiert	93,4	93,4	92,1
Erlaubt	6,2	6,6	7,9
Großzügig erlaubt	0,4	0,0	0,0
Nicht erlaubt	0,0	0,0	0,0

^a Die Werte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben.

^b $R_{\text{work}} = \sum_h |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$.

^c Der freie R -Faktor wurde aus 5% der Daten errechnet, die zufällig ausgewählt und vor der Strukturverfeinerung entfernt worden waren.

Tabelle A2. Statistiken der Datensammlung und Modellverfeinerung der MeTr-Mutanten.

Datensammlung	MeTr (D44A)	MeTr (D76N)	MeTr (D161N)
Wellenlänge (Å)	0,91841	0,91841	0,91841
Raumgruppe	<i>P</i> 4 ₃ 2 ₁ 2	<i>P</i> 4 ₃ 2 ₁ 2	<i>P</i> 4 ₃ 2 ₁ 2
Zellkonstanten			
<i>a</i> ; <i>b</i> ; <i>c</i> (Å)	64,3; 64,3; 174,7	64,9; 64,9; 176,6	64,7; 64,7; 176,7
α ; β ; γ (°)	90; 90; 90	90; 90; 90	90; 90; 90
Beobachtete ^a / einzigartige Reflexe ^a	103.617 / 16.302	153.146 / 20.642	19.6405 / 20.597
<i>R</i> _{merge} ^a	7,1 (142,1)	6,9 (42,6)	5,7 (43,2)
<i>R</i> _{pim} ^a	3,0 (66,5)	2,6 (15,8)	1,9 (14,5)
<i>CC</i> 1/2 ^a	99,9 (82,4)	99,9 (93,1)	99,9 (97,3)
<i>I</i> / σ <i>I</i> ^a	18,4 (1,3)	16,5 (3,8)	29,2 (6,4)
Auflösung (Å) ^a	44,0 – 2,3 (2,39 – 2,31)	36,2 – 2,1 (2,18 – 2,10)	43,5 – 2,2 (2,25 – 2,17)
Vollständigkeit (%) ^a	96,2 (93,9)	90,1 (92,5)	99,9 (99,7)
Verfeinerung			
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^{a,b,c}	23,0 / 27,8 (33,7 / 40,8)	20,4 / 23,6 (25,9 / 28,7)	18,0 / 22,5 (20,8 / 25,4)
<i>r.m.s.</i> -Abweichung			
Bindungslänge (Å)	0,004	0,003	0,006
Bindungswinkel (°)	0,90	0,84	1,03
Ramachandran Statistik (%)			
Favorisiert	95,9	98,5	98,5
Erlaubt	4,1	1,5	1,5
Nicht erlaubt	0,0	0,0	0,0

^a Die Werte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben.^b $R_{\text{work}} = \sum_h ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$.^c Der freie *R*-Faktor wurde aus 5% der Daten errechnet, die zufällig ausgewählt und vor der Strukturverfeinerung entfernt worden waren.

Tabelle A3. Statistiken der Datensammlung und Modellverfeinerung für CoFeSP (nach [69]).

Datensammlung	CoFeSP
Wellenlänge (Å)	0,91841
Raumgruppe	C2
Zellkonstanten	
<i>a</i> ; <i>b</i> ; <i>c</i> (Å)	172,2; 43,5; 101,9
α ; β ; γ (°)	90; 119,4; 90
Beobachtete ^a / einzigartige Reflexe ^a	194618 / 48286
R_s ^a (%)	10,3 (53,9)
Auflösung (Å) ^a	35 – 1,95 (1,95 – 2,0)
Vollständigkeit (%) ^a	99,3 (99,4)
$I/\sigma I$ ^a	10,4 (2,6)
Verfeinerung	
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}(\%)^{a,b,c}$	19,2 / 25,1
Durchschn. <i>B</i> -Faktor	
Gesamt	24,9
CfsA (N-terminale Domäne / N-M <i>linker</i> / mittlere Domäne /	44,2 / 30,0 / 19,3 /
M-C <i>linker</i> / C-terminale Domäne / [4Fe4S]-Cluster / Corrinoid)	26,3 / 25,4 / 37,3 / 21,1
CfsB	24,3
Wasser	30,2
<i>r.m.s.</i> -Abweichung	
Bindungslänge (Å)	0,012
Bindungswinkel (°)	1,647
Ramachandran Statistik (%)	
Favorisiert	95,2
Erlaubt	4,3
Großzügig erlaubt	0,5
Nicht erlaubt	0,0

^a Die Werte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben.

^b $R_{\text{work}} = \sum_h ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$.

^c Der freie *R*-Faktor wurde aus 5% der Daten errechnet, die zufällig ausgewählt und vor der Strukturverfeinerung entfernt worden waren.

Tabelle A4. Statistiken der Datensammlung und Modellverfeinerung für die C-terminale Domäne von ACS .

Datensammlung	Apo	X-Ni	Ni-Ni (2,4 Å)	Ni-Ni (1,4 Å)
Wellenlänge (Å)	0,91841	0,91841	0,91841	0,826561
Raumgruppe	<i>C</i> 222 ₁	<i>I</i> 4 ₁	<i>P</i> 312 ₁	<i>I</i> 4 ₁ 22
Zellkonstanten				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	69,5, 85,9, 164,4	75,6, 75,6, 183,5	91,7, 91,7, 230,5	75,2, 75,2, 181,1
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 120	90, 90, 90
Beobachtete ^a / einzigartige Reflexe ^a	414.364 (39771) / 112179 (10993)	252138 (24865) / 65958 (6573)	261637 (25787) / 47121 (4616)	1285139 (100841) / 51618 (5005)
Wilson <i>B</i> -Faktor	11,97	13,91	23,87	17,31
<i>R</i> _{merge} ^a	4,5 (47,4)	6,7 (59,0)	14,6 (64,3)	8,0 (160,9)
<i>R</i> _{pim} ^a	2,6 (28,8)	4,0 (34,6)	6,8 (29,8)	1,6 (36,6)
<i>CC</i> 1/2 ^a	99,9 (82,9)	99,9 (83,8)	99,4 (78,1)	100,0 (74,7)
Auflösung (Å) ^a	45,14-1,33 (1,38-1,33)	33,24-1,61 (1,67-1,61)	46,64-2,36 (2,44-2,36)	29,40-1,40 (1,45-1,40)
Vollständigkeit (%) ^a	99,3 (98,1)	99,7 (99,9)	99,9 (99,6)	99,9 (99,3)
<i>I</i> / σ ^a	15,8 (2,5)	13,5 (2,6)	12,5 (2,9)	25,9 (2,4)
Verfeinerung				
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^{a,b,c}	16,6 (25,1) / 18,0 (27,4)	15,1 (22,4) / 19,3 (26,4)	17,3 (23,2) / 21,3 (26,5)	14,2 (25,6) / 17,0 (28,1)
<i>r.m.s.</i> -Abweichung				
Bindungslänge (Å)	0,009	0,021	0,005	0,019
Bindungswinkel(°)	1,84	2,08	0,97	1,79
Ramachandran Statistik(%)				
Favorisiert	98,7	97,4	98,2	98,0
Erlaubt	1,3	2,1	1,4	1,7
Nicht erlaubt	0	0,4	0,4	0,4
Anzahl der Atome	4357	4280	7920	2227
Protein	3702	3652	7272	1868
Liganden	42	40	40	26
Wasser	613	588	608	333
Durchschn. <i>B</i> -Faktor	16,2	15,5	16,1	23,0
Protein	14,3	13,9	15,9	20,9
Liganden	13,7	15,7	12,7	19,0
Wasser	28,3	25,9	19,0	35,0

^a Die Werte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben

^b $R_{\text{work}} = \sum_h ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$

^c Der freie R -Faktor wurde aus 5% der Daten errechnet, die zufällig ausgewählt und vor der Strukturverfeinerung entfernt worden waren.

Tabelle A5. Gemessene Winkel der beiden Ni_p-Koordinationen der C-terminalen ACS Struktur.

Verzerrt quadratisch pyramidal (Ni_{p1})	Winkel (°)
S _γ (Cys ₆₀₀)-Ni _{p1} -S _γ (Cys ₅₉₈)	65,38
Imd _{2a} -Ni-S _γ (Cys ₆₀₀)	93,94
S _γ (Cys ₅₁₂)-Ni _{p1} -Imd _{2a}	97,68
S _γ (Cys ₅₁₂)-Ni _{p1} -S _γ (Cys ₅₉₈)	90,21
Imd ₁ -Ni _{p1} -S _γ (Cys ₅₉₈)	97,93
Imd ₁ -Ni _{p1} -S _γ (Cys ₆₀₀)	112,99
Imd ₁ -Ni _{p1} -Imd _{2a}	100,93
Imd ₁ -Ni _{p1} -S _γ (Cys ₅₁₂)	107,19
S _γ (Cys ₆₀₀)-Ni _{p1} -S _γ (Cys ₅₁₂)	134,99
Imd _{2a} -Ni _{p1} -S _γ (Cys ₅₉₈)	156,33
Quadratisch planar (Ni_{p2})	
S _γ (Cys ₆₀₀)-Ni _{p2} -S _γ (Cys ₅₉₈)	83,59
S _γ (Cys ₆₀₀)-Ni _{p2} -Imd _{2b}	93,48
Imd _{2b} -Ni _{p2} -S _γ (Cys ₅₁₂)	77,76
S _γ (Cys ₅₁₂)-Ni _{p2} -S _γ (Cys ₅₉₈)	106,12
S _γ (Cys ₆₀₀)-Ni _{p2} -S _γ (Cys ₅₁₂)	169,51
Imd _{2b} -Ni _{p2} -S _γ (Cys ₅₉₈)	168,54

7.2 Weitere Abbildungen

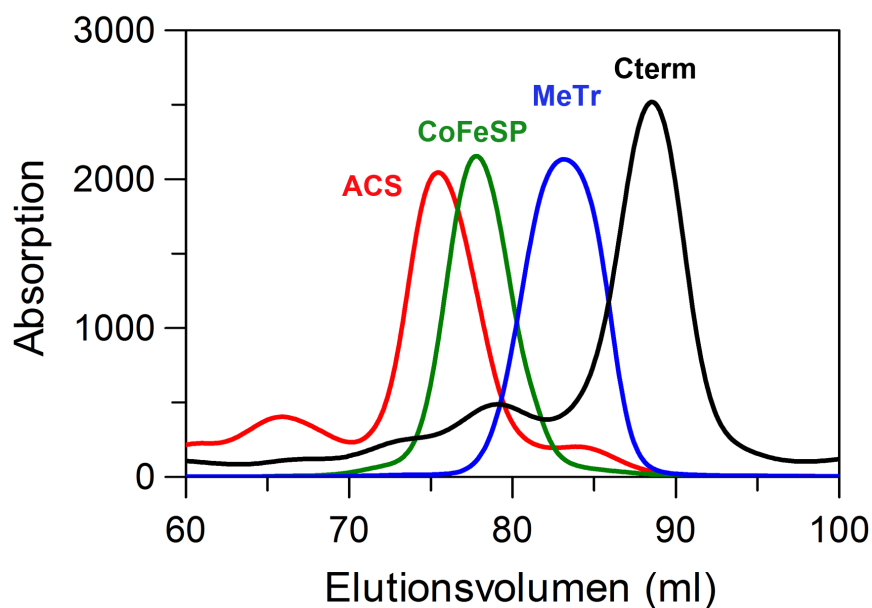


Abbildung A1. Elutionsprofile der analytische Gelfiltration. ACS, CoFeSP, MeTr und die C-terminale Domäne der ACS zeigen Absorptionsmaxima nach 76 ml, 78 ml, 83 ml und 89 ml. Zur Ermittlung der jeweiligen Molekülmasse (M_t) wurde eine Eichgerade mit der Gleichung:
 $\log M_t = -0,032 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{Elutionsvolumen} + 4,394$ verwendet.

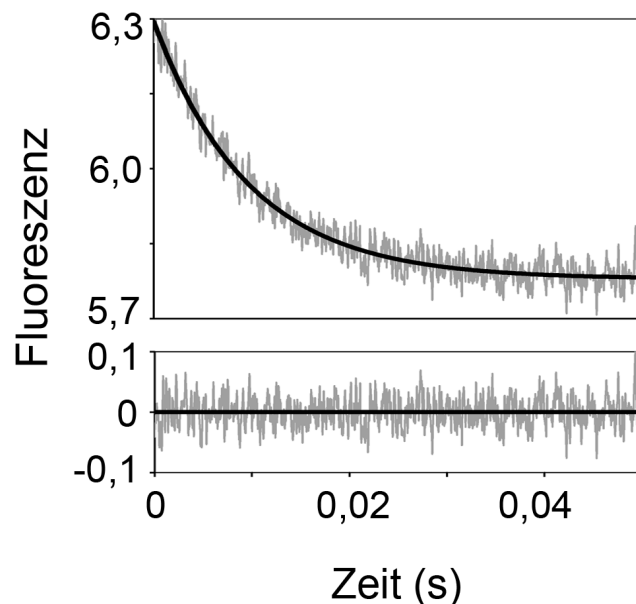


Abbildung A2. Kinetik der MeTHF-Bindung an MeTr. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Anpassung eines gemittelten Transienten (7,5 μM MeTHF) mit einer Exponentialfunktion (Gleichung 7, $i = 1$), sowie den zugehörigen Residualplot.

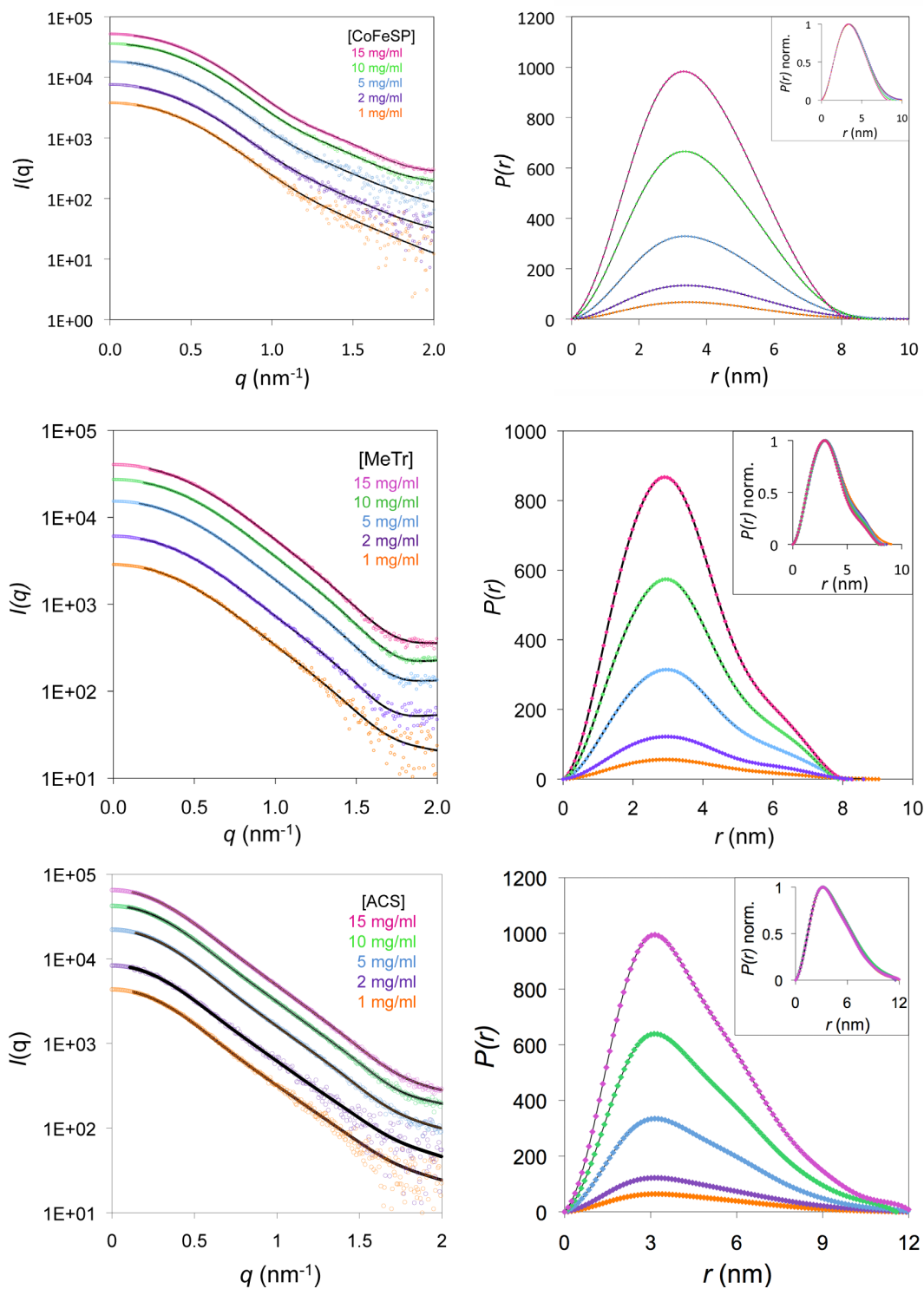


Abbildung A3. Röntgenkleinwinkelstreuexperimente für CoFeSP, MeTr und ACS. Die linke Abbildung zeigt jeweils die Streuintensität (I) in Abhängigkeit des Streuwinkels (q) für verschiedene Proteinkonzentrationen. Rechts sind unter Beibehaltung der Farbgebung die zugehörigen Abstandsverteilungen dargestellt. Das *inset* zeigt zum besseren Vergleich die auf die Intensität der höchsten Proteinkonzentration (15 mg/ml) normierten Abstandsverteilungen.

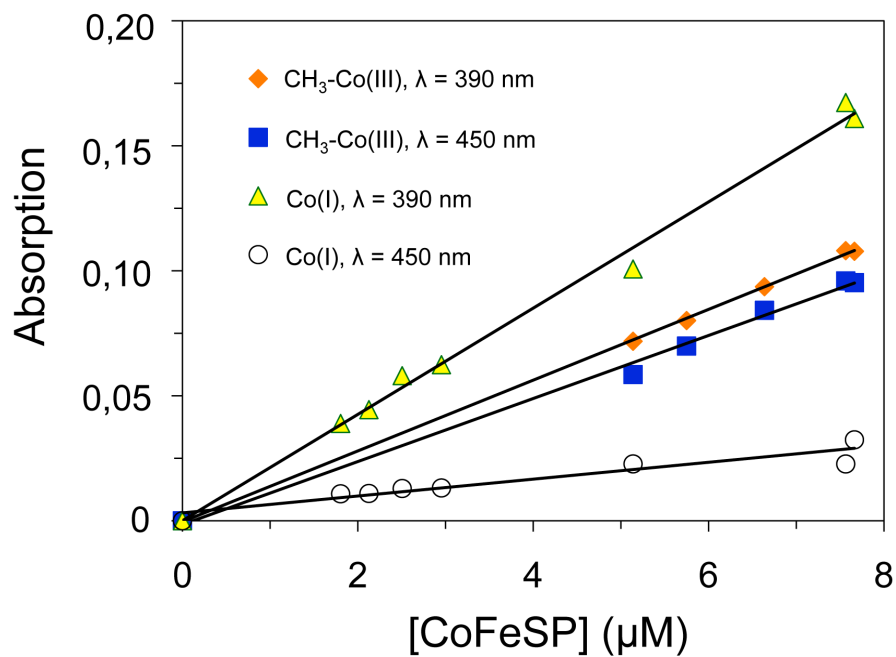


Abbildung A4. Bestimmung der CoFeSP-Extinktionskoeffizienten. Hierfür wurden die Absorptionswerte verschiedener Konzentrationen (0 - 8 μM) an Co(I)CoFeSP und CH₃-Co(III)CoFeSP bei 390 und 450 nm gemessen und gegen die jeweilige Proteinkonzentration aufgetragen.

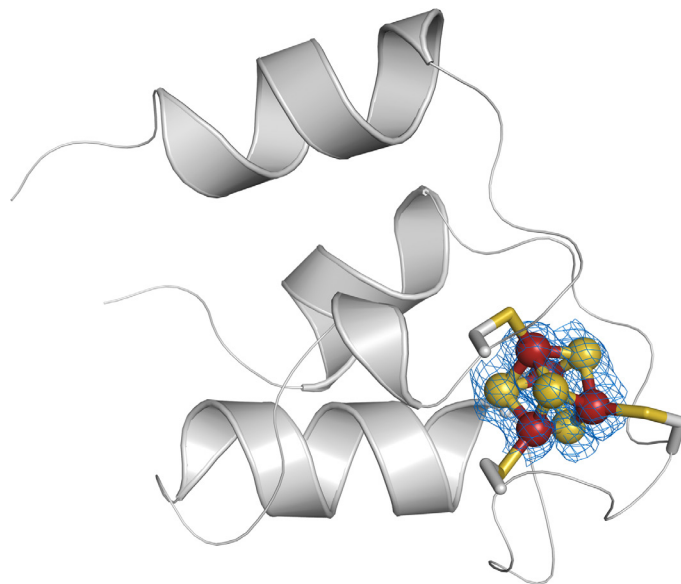


Abbildung A5. Bändermodell der N-terminalen CfsA-Domäne von CoFeSP (PDB-Nummer 2YCL, nach [69]). Eine F_o-F_c -omit map für den [4Fe4S]-Cluster ist in blauen Maschen dargestellt (Konturlevel 5,0 σ). Die koordinierenden Cystein-Seitenketten sind als Stäbchenmodell abgebildet.

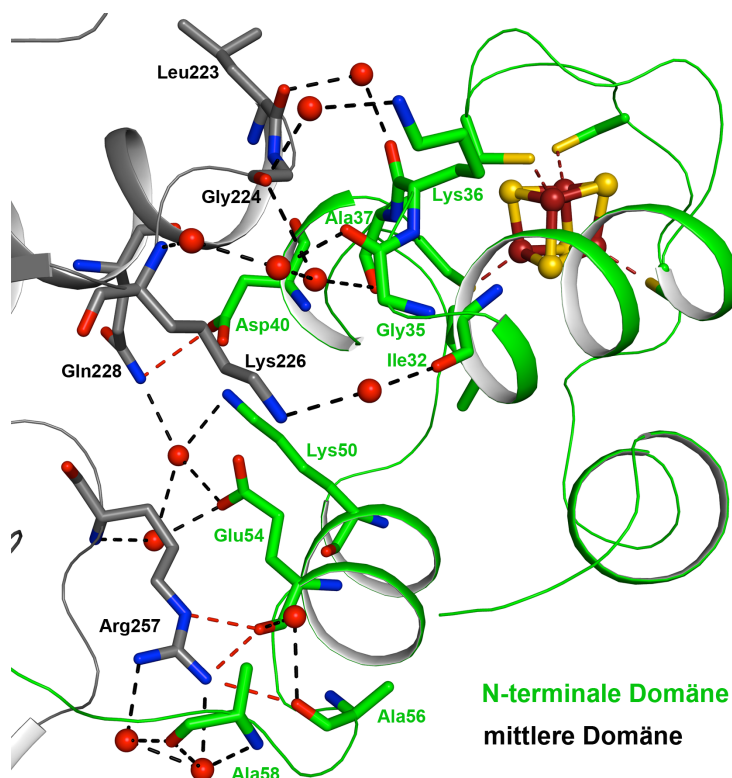


Abbildung A6. Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen der N-terminalen und mittleren CfsA-Domäne von CoFeSP (PDB-Nummer 2YCL, nach [69]). Die N-terminale Domäne ist dabei als grünes Bändermodell, die mittlere Domäne als graues Bändermodell abgebildet. Direkte Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren sind dabei als rote unterbrochene Linien, Wechselwirkungen über Wassermoleküle (rote Kugeln) sind als schwarze unterbrochene Linien dargestellt.

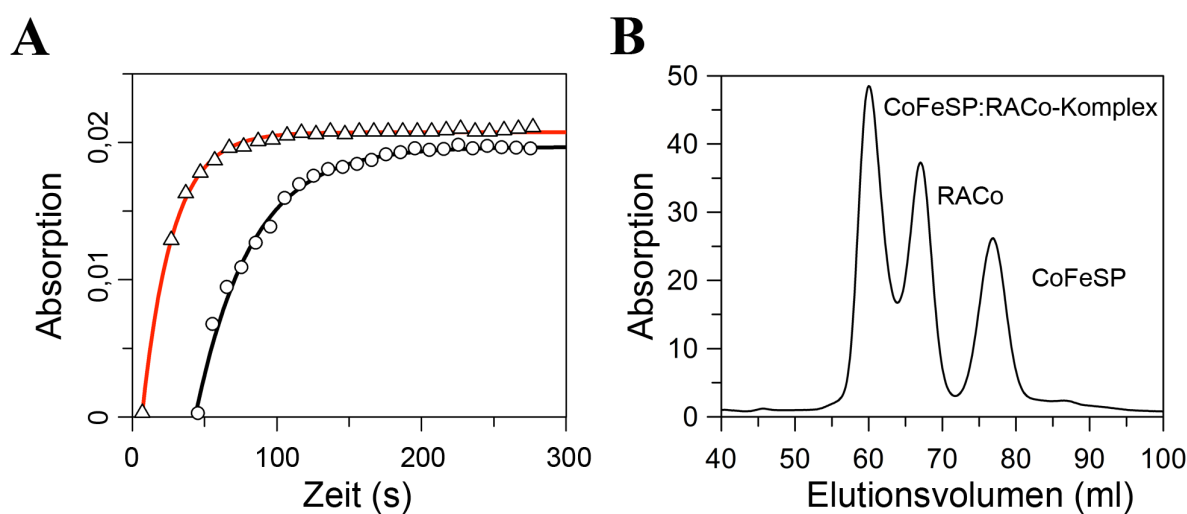


Abbildung A7. Interaktion der CoFeSP-Tripelmutante mit RACo. A) Der ATP-abhängige Elektronentransfer von RACo auf Co(II)CoFeSP wurde wie von Hennig *et al.* [22] beschrieben für WT-CoFeSP (Kreise) und die Tripelmutante (Dreiecke) gemessen. Die Co(I)-Bildung wurde anhand der

Absorptionszunahme bei 390 nm verfolgt. Die Raten von $0,038 \text{ s}^{-1}$ für WT bzw. $0,044 \text{ s}^{-1}$ für die Mutante wurden durch die Anpassung der Datenpunkte (durchgezogene Linien) mit einer Exponentialfunktion (Gleichung 7) ermittelt. B) zeigt die Komplexbildung der CoFeSP-Trippelmutante mit RACo anhand einer analytischen Gelfiltration. Hierfür wurden equimolare Konzentrationen ($20 \text{ }\mu\text{M}$) an RACo und der CoFeSP-Mutante gemischt und nach 20 min auf eine Superdex 200 *prep grade* Gelfiltrationssäule geladen.

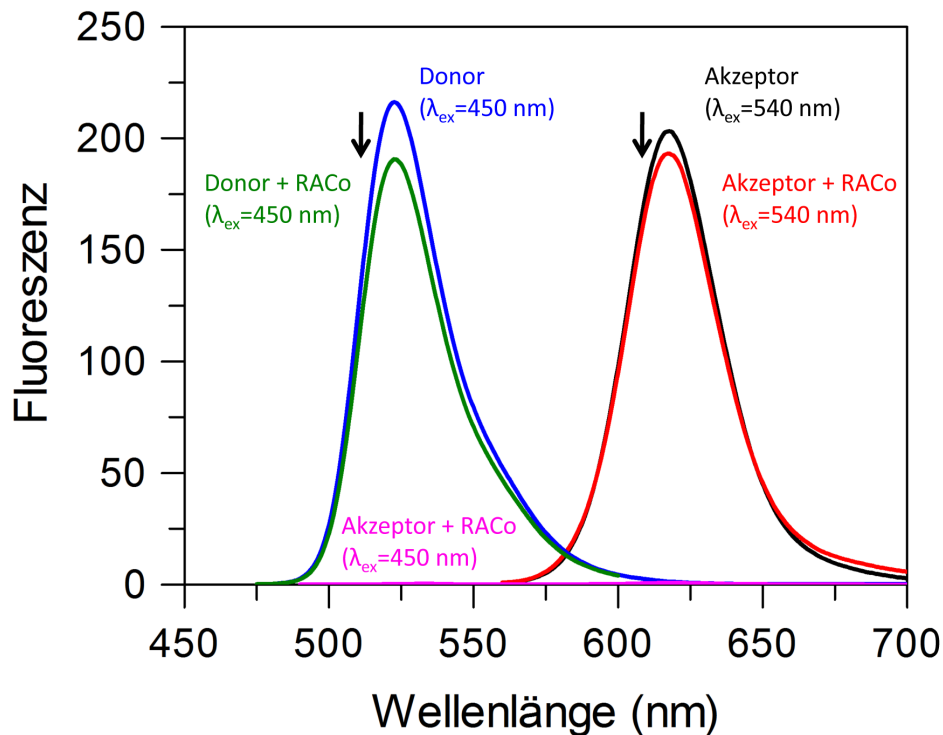
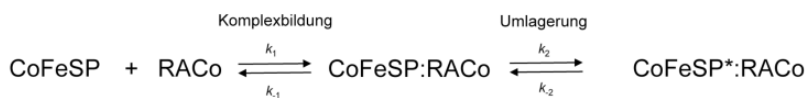
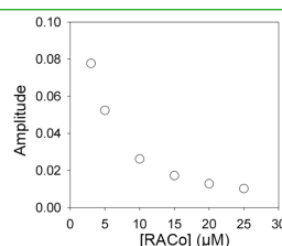
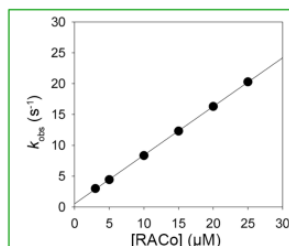
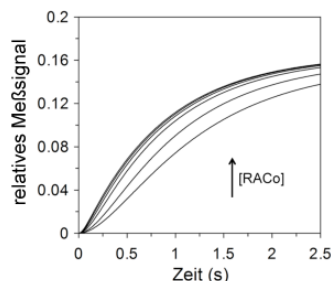


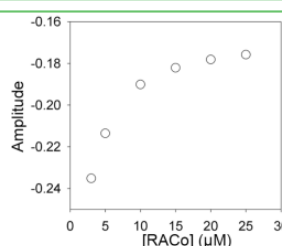
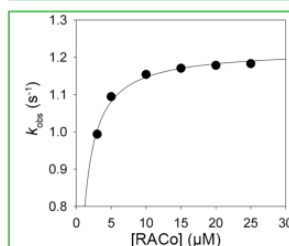
Abbildung A8. FRET-Kontrollexperimente. Es wurden Fluoreszenzspektren für die CoFeSP-Trippelmutante, an welche nur Donor-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, vor (blaue Linie) und nach RACo-Zugabe (grüne Linie) aufgenommen. Die Anregungswellenlänge (λ_{ex}) betrug in beiden Fällen 450 nm. Für die mit ausschließlich Akzeptor markierte CoFeSP-Mutante wurden ebenso Fluoreszenzspektren vor (schwarze Linie) und nach RACo-Zugabe (rote Linie) bei $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$ aufgenommen. Bei $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ konnte für die Akzeptor-markierte CoFeSP-Mutante nach RACo-Zugabe keine signifikante Fluoreszenz beobachtet werden. In keinem der Kontrollexperimente konnte die in FRET-Experimenten (siehe Abschnitt 3.2.6.2) gemessene Fluoreszenzzunahme bei 620 nm beobachtet werden.

Induced fit**1. Fall:**

Komplexbildung ~ Umlagerung

**1. Phase**

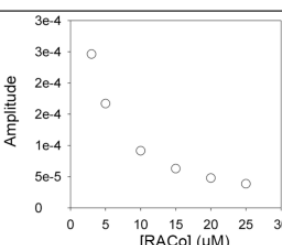
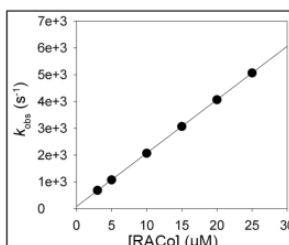
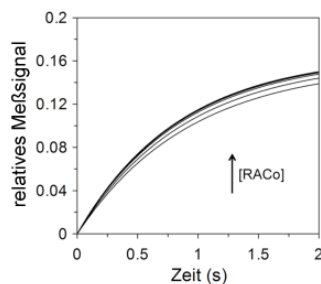
- große Amplituden
- langsame Raten
- k_{obs} vs. $[\text{RACo}]$: linear

**2. Phase**

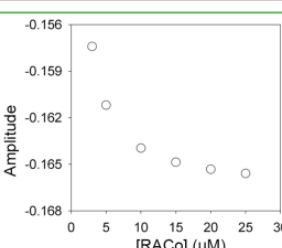
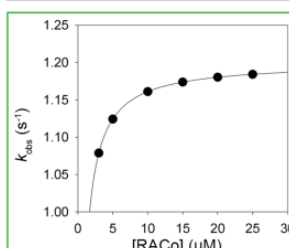
- große Amplituden
- langsame Raten
- k_{obs} vs. $[\text{RACo}]$: hyperbol

2. Fall:

Komplexbildung >> Umlagerung

**1. Phase**

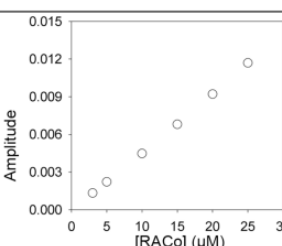
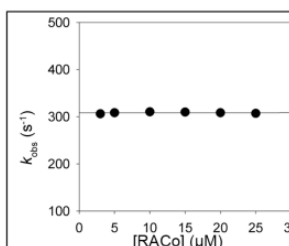
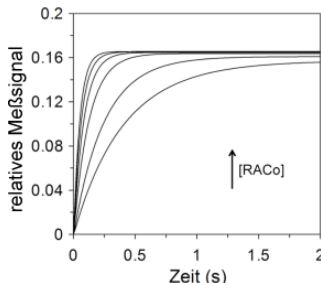
- kleine Amplituden
- schnelle Raten
- k_{obs} vs. $[\text{RACo}]$: linear

**2. Phase**

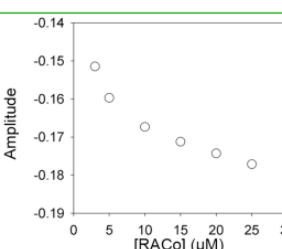
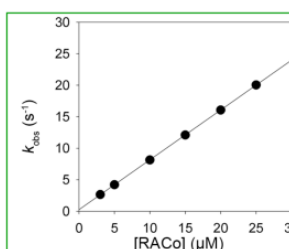
- große Amplituden
- langsame Raten
- k_{obs} vs. $[\text{RACo}]$: hyperbol

3. Fall:

Komplexbildung << Umlagerung

**1. Phase**

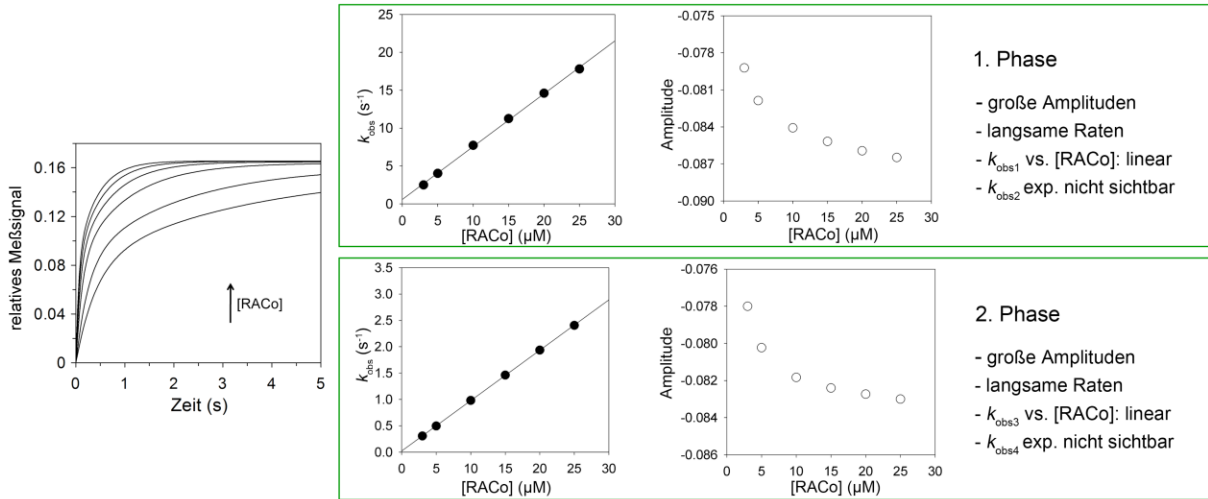
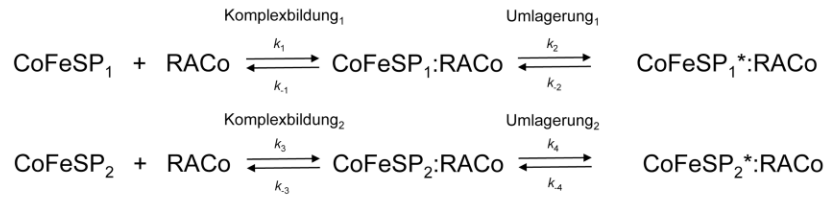
- kleine Amplituden
- schnelle Raten
- k_{obs} vs. $[\text{RACo}]$: linear

**2. Phase**

- große Amplituden
- langsame Raten
- k_{obs} vs. $[\text{RACo}]$: linear

Induced fit**4. Fall:**

2 CoFeSP Spezies

Komplexbildung₁ << Umlagerung₁Komplexbildung₂ << Umlagerung₂Komplexbildung₂ < Komplexbildung₁**Conform. selection**

2 CoFeSP Spezies

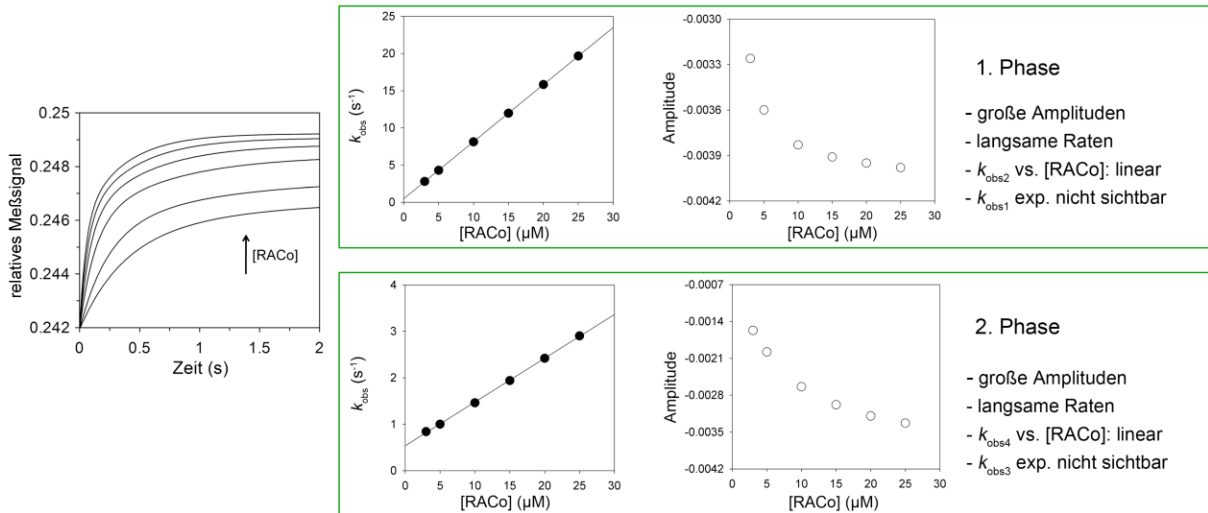
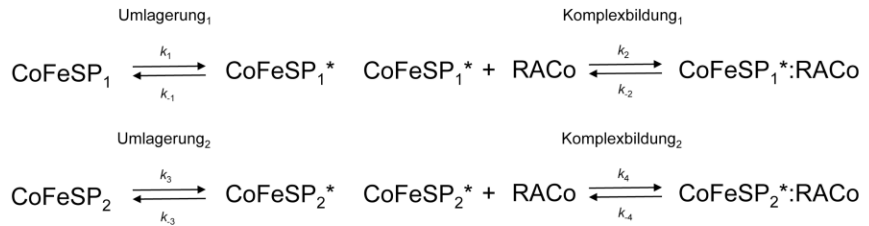
Komplexbildung₁ << Umlagerung₁Komplexbildung₂ << Umlagerung₂Komplexbildung₂ < Komplexbildung₁

Abbildung A9. Simulation des FRET-Experiments. Die Daten wurden mit KinTek-Explorer (KinTek Corporation, USA) erstellt. Hierfür wurden jeweils 0,25 μM CoFeSP, sechs RACo-Konzentration (3, 5, 10, 15, 20 und 25 μM) und die folgenden Parameter eingesetzt:

1. Fall: $k_1 = 0,8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-1} = 0,4 \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 0,8 \text{ s}^{-1}$, $k_{-2} = 0,4 \text{ s}^{-1}$.

2. Fall: $k_1 = 200 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-1} = 100 \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 0,8 \text{ s}^{-1}$, $k_{-2} = 0,4 \text{ s}^{-1}$.

3. Fall: $k_1 = 0,8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-1} = 0,4 \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 200 \text{ s}^{-1}$, $k_{-2} = 100 \text{ s}^{-1}$.

4. Fall: $[\text{CoFeSP}_1] = [\text{CoFeSP}_2] = 0,125 \mu\text{M}$, $k_1 = 0,8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-1} = 0,4 \text{s}^{-1}$;

$k_2 = 200 \text{s}^{-1}$, $k_{-2} = 100 \text{s}^{-1}$; $k_3 = 0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-3} = 0,05 \text{s}^{-1}$; $k_4 = 200 \text{s}^{-1}$, $k_{-4} = 100 \text{s}^{-1}$.

Conf. selection: $k_1 = 3000 \text{s}^{-1}$, $k_{-1} = 100 \text{s}^{-1}$; $k_2 = 0,8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-2} = 0,4 \text{s}^{-1}$;

$k_3 = 3000 \text{s}^{-1}$, $k_{-3} = 100 \text{s}^{-1}$; $k_4 = 0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-4} = 0,05 \text{s}^{-1}$.

Die simulierten Progresskurven wurden mit Gleichung 7 und die k_{obs} -Werte mit den Gleichungen 13 und 14 angepasst. Links sind die jeweiligen Transienten, mittig die zugehörigen k_{obs} -Werte und rechts die Amplituden in Abhängigkeit der RACo-Konzentration abgebildet. Die experimentell fassbaren Phasen sind grün, die experimentell vermutlich nicht sichtbaren Phasen sind schwarz umrandet.

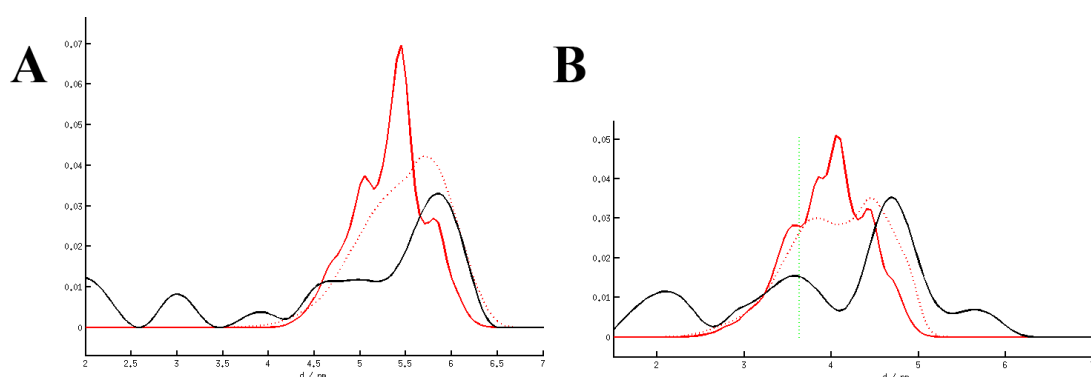


Abbildung A10. Simulation der MTS-Rotamer-Abstandsverteilung. Die Abbildungen für CoFeSP (A) und den CoFeSP:RACo-Komplex (B) wurden von Dr. Christian Teutloff (Freie Universität Berlin) erstellt. Die experimentelle Abstandsverteilung des PELDOR-Experiments ist als schwarze Linie dargestellt. Die theoretische Verteilung unter der Annahme starrer, dem Spinmarker benachbarter Proteinseitenketten ist als durchgezogene rote Linie und unter der Annahme flexibler Seitenketten als unterbrochene rote Linie abgebildet.

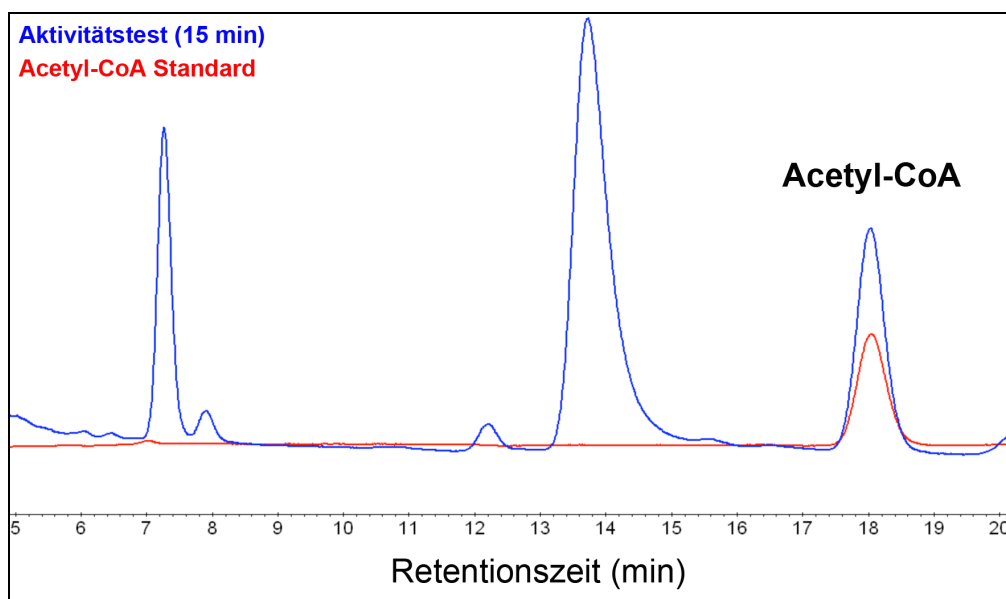


Abbildung A11. HPLC-Analyse der Acetyl-CoA-Bildung durch ACS. Die Abbildung zeigt eine Überlagerung der Elutionsprofile des ACS-Aktivitätstest nach 15 min (blaue Linie) und eines Acetyl-CoA-Standards (rote Linie). Die Elution von der C18 *reversed phase* Säule erfolgte bei 25 °C isokratisch mit 15% (v/v) Methanol in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,3). Die Retentionszeit für Acetyl-CoA betrug unter diesen Bedingungen ca. 18 min.

```

AcsF_Mt      MARHIAVAGKGGTGKTTFAALMIRYLIQGKGSILAVDADPNANLNEALGVQIDTAIADI 60
CooC2_Ch     MAFKIAVAGKGGTGKTTFSALVIKQLMSGKRPILAVDADANANLNEALGLQVEQAISDV 60
** :*****:***: * : . * .*****.*****:***: **::

AcsF_Mt      LD-ATKNPKSIPEGMSKEIFVQYQLAQALVETKDFDLLTMGRPQGGPGCYCYPNDLLRKHL 119
CooC2_Ch     INRLAKNMDPIPAGMTKDQYISFKIHETLSEGGDDVLLVMGGPEGQGCYCYANNLLRQFI 120
:: :** ..** ***: :::: :* * *.****.* *:* *****.*:***::

AcsF_Mt      ETLSDNYDYMIIIDSEAGLEHISRRI IQNVSDLFVI SDASARGIRSAGRVRELQELQLPI 179
CooC2_Ch     LTLSNNYPYIVMDNEAGMEHLSRRTTDEVDVFFVI SDGSVRGIRSAGRI KQLIDSLDLKI 180
***:** *:::*.***:**:*** :*: . :*****.*.*****:***:..*:* *

AcsF_Mt      NNLYLIVTKTTG-DIAPLQEEIERTGIPLTGVTPTYDEQIVDYDIH SKPLFDLPATSVSVQ 238
CooC2_Ch     KEKYLVI TRIEEKDIPEVQEEIEKTGLKLIGVIPNDELVT EFD RY SKPLINLPEDSKAVV 240
:: **:***: ** . :*****:**: * * * * * :::* :*****:** * :*

AcsF_Mt      AVKAILARCQF- 249
CooC2_Ch     AVKKILQNAGII 252
*** ** .. :

```

Abbildung A12. Aminosäuresequenzvergleich von AcsF aus *M. thermoacetica* (AcsF_Mt) und CooC2 aus *C. hydrogenoformans* (CooC2_Ch). Die Aminosäuresequenzen wurden mittels ClustalW [91] verglichen, was eine Sequenzidentität von 54% ergab. Identische Reste sind mit „*“, konservierte Reste mit „:“ und semikonservierte Reste mit „.“ gekennzeichnet.

8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek für die Bereitstellung des vielseitigen Themas, seine hilfreichen Ratschläge, das in mich gesetzte Vertrauen und die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Arbeitsgruppe.

Besonders danken möchte ich Dr. Jae-Hun Jeoung, der mir in den letzten Jahren immer zur Seite stand, sowohl fachlich, als auch als Freund. Die geselligen Kaffeepausen werden mir fehlen! Des Weiteren danke ich ihm für viele wertvolle Vorschläge und die Einführung in die Proteinkristallographie.

Sandra danke ich für die Bereitstellung von RACo und unsere geteilte Doktorandenzeit.

Jochen, Sandra, Tobias und Jae-Hun danke ich vielmals für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Vielen Dank Tobias für die Einweisung an ITC und *stopped-flow*, für deine Hilfsbereitschaft bei den Messungen und für die Unterstützung bei der Simulation kinetischer Daten. Ich danke dir außerdem für viele hilfreiche Ideen, sowie für die zahlreichen Diskussionen über Hörspiele und das Neuste aus der Welt der Politik.

Ich danke meinen Laborkollegen Barbara, Berta, Brinda, Christina, Jae-Hun, Jochen, Lilith, Martin, Olivia, Rainer, Sandra, Silke, Simon, Stefan, Tobias, Tzong-Yuan, Yulia und allen HiWis für die freundliche Atmosphäre bei der Arbeit und unsere gemeinsamen Aktivitäten außerhalb des Labors.

Rainer, du bist der Beste !

Vielen Dank auch allen Kooperationspartnern für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke meinen Freunden, die mich trotz des Exils nicht vergessen haben und mich gekonnt vom Arbeitsalltag ablenken.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, die mich bedingungslos unterstützt und immer für mich da ist. Natalie und Daria, erst ihr macht Berlin zu einer wunderschönen, liebenswerten Stadt.

9 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den